ZUR ROLLE VON THIOLEN BEI DER FREISETZUNG VON INSULIN UND DER BILDUNG VON cAMP IN DER LANGERHANS'SCHEN INSEL DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Mustafa A. Abdel Hamid
aus Kairo/Ägypten

1983

ZUR ROLLE VON THIOLEN BEI DER FREISETZUNG VON INSULIN UND DER BILDUNG VON cAMP IN DER LANGERHANS'SCHEN INSEL DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Mustafa A. Abdel Hamid
aus Kairo/Ägypten

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 1983
Dekan: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. P. T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1978 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1982 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für das gewährte Stipendium sowie die Finanzierung des Schreibens und Druckens dieser Dissertation.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon, insbesondere Frau Hagenloh für die gute Zusammenarbeit während der Versuche zur Methodik.

MEINER FRAU ,

SARAH und AYMAN

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0001

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
B	Zählrate Standard oder Probe
B_o	Zählrate Nullwert
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP-Salz	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methyl-piperazid)
DTNB	5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) Ellmans Reagens
fmol	Femtomol
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	immunoreaktives Insulin
KIC	∝-Ketoisocapronsäure
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarkonatlösung
µE	Mikroeinheiten
mM	millimolar
µM	mikromolar
min	Minuten
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid,

NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant
P	Probability
pCMB	para-Chloromercuribenzoat
pmol	Picomol
POD	Glutathionperoxidase
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of the mean
U	Einheiten

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.1.1.	Gegenwärtiger Stand der Kenntnisse zum Mechanismus der Glucose induzierten Insulinsekretion	1
1.1.2	Rolle von Thiolen bei der Sekretion von Insulin	5
1.1.3.	Glucosemetabolismus und Thiolgruppen	8
1.1.4.	Allgemeine Bedeutung vom GSH für die Zellstoffwechsel	9
1.1.5.	Thiol abhängige Stoffwechselvorgänge der Langerhans'schen Insel	12
1.2.	Fragestellung	15
2.	METHODIK	16
2.1.	Versuchstiere	16
2.2.	Geräte	16
2.3.	Chemikalien und Enzyme	18
2.4.	Nähr- und Reagenzlösungen	20
2.4.1.	Hank's Lösung	20
2.4.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	20
2.4.3.	Perfusionslösungen	21
2.4.3.1.	Stabilität der untersuchten Thiolverbindungen in den Perfusionslösungen	22

2.4.4.	0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2	23
2.4.5.	Acetylierungsgemisch	23
2.5.	Experimenteller Teil	25
2.5.1.	Isoliertes perfundiertes Rattenpankreas modifiziert nach Curry et al., (1968)	25
2.5.1.1.	Operation	25
2.5.1.2.	Perfusionsprotokoll	28
2.5.1.3.	Durchführung der Perfusion	29
2.5.2.	Insulin-Bestimmung	30
2.5.3.	Isolierte Langerhans'sche Inseln nach Lacy und Kostianovsky (1967)	33
2.5.3.1.	Vorinkubation der Inseln	34
2.5.3.2.	Hauptinkubation der Inseln für Messung des cAMP Gehaltes	34
2.5.3.2.1.	Äquilibrierungszeit	34
2.5.3.2.2.	Reaktionszeit	35
2.5.3.3.	Aufarbeitung der inkubierten Inseln zur cAMP-Bestimmung	36
2.5.3.3.1.	Gewebefixierung	37
2.5.3.3.2.	Extraktion von cAMP aus denaturiertem Inselgewebe	38
2.5.3.3.3.	Bestimmung des Restvolumens	38
2.5.3.4.	Zusammenfassung der Aufarbeitungsmethode der Inseln für die cAMP-Bestimmung	39
2.5.3.5.	Radioimmunologische cAMP-Bestimmung mit dem Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit der Firma New England Nuclear (NEN-Kit)	40

2.5.4.	Hauptinkubation der Inseln für die Messung der Insulinsekretion aus isolierte Inseln	41
2.5.4.1.	Wahl eines geeigneten Inkubationszeitraums	42
2.5.4.2.	Einfluß verschiedener Konzentrationen von reduziertem Glutathion auf die durch 11,1 mM Glucose freigesetzte Menge an Insulin	44
2.5.4.3.	Einfluß von Diamid und t-BHP auf den RIA	44
2.5.5.	Berechnung der Versuchsergebnisse	44
2.5.6.	Auswertung der Versuchsergebnisse und Statistik	49
3.	VERSUCHSERGEBNISSE	51
3.1.	Isoliert-perfundiertes Rattenpankreas	51
3.1.1.	Einfluß von t-Butylhydroperoxid (t.BHP) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion	51
3.1.2.	Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion	54
3.1.3.	Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch 0,2 mg/ml Tolbutamid induzierte Insulinsekretion	58
3.1.4.	Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch 0,1 mg/ml Tolbu-	59

tamid + 5,6 mM Glucose hervorgerufene Insulinsekretion

3.2. cAMP-Gehalt Langerhans'scher Inseln 61

3.2.1. cAMP-Gehalt Langerhans'scher Inseln in Gegenwart von GSH 61

3.2.1.1. Abhängigkeit von Glucose- und GSH-Konzentration 61

3.3. Thiolabhängigkeit der Insulinsekretion aus isolierten Langerhans'schen Inseln bei Verwendung verschiedener Stimulatoren 65

3.3.1. Einfluß von reduziertem Glutathion und von Diamid auf die durch Glucose, Fructose, Mannose und Glyzerinaldehyd induzierte Insulinsekretion 65

3.3.2. Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Tolbutamid induzierte Sekretion von Inseln 67

3.3.3. Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Leucin und Arginin induzierte Insulinsekretion 69

3.3.4. Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Glucagon, Isoprenalin und dibutyrylcyclo-AMP induzierte Sekretion von Insulin 69

4. DISKUSSION 72

4.1. Darstellung der Literatur zur Insulin freisetzenden Wirkung von Glucose, Fructose, Mannose, Glycerinaldehyd, Tolbutamid, Leucin, Arginin, Glucagon, Iso- 72

	prenalin und db-cAMP	
4.1.1.	Monosaccharide	72
4.1.2.	Sulfonylharnstoffe	73
4.1.3.	Arginin und Leucin	75
4.1.4.	Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP	77
4.2.	Einfluß von Thiolen auf die durch Glucose und Tolbutamid induzierte Sekretion von Insulin beim perfundierten Pankreas	79
4.3.	Thiolabhängige und nicht thiolabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion	81
4.4.	Thiole und cAMP-Anstieg	87
5.	ZUSAMMENFASSUNG	89
5.1.	Zielsetzung	89
5.2.	Ergebnisse	89
5.3.	Schlußfolgerungen	90
6.	LITERATURVERZEICHNIS	92

1. EINLEITUNG

1.1. Stand der Forschung

1.1.1. Gegenwärtiger Stand der Kenntnisse zum Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Von Ashcroft (1980) wurde der Stand der Kenntnisse über den Mechanismus der Insulinsekretion und insbesondere die Bedeutung von Glucosestoffwechsels und Ionenverschiebungen in diesem Mechanismus schematisch dargestellt. Wie die Abb. 1 zeigt, führt Glucose über seinen Metabolismus zur Zunahme der Calciumkonzentration im Zytoplasma. Calcium gebunden an Calmodulin bewirkt einerseits eine Phosphorylierung von Protein, andererseits wirkt es auf Mikrotubuli und Mikrofilamente. Durch letztere Wirkung bzw. durch eine Änderung der Membraneigenschaften nach Phosphorylierung kommt es zur Sekretion von Insulin. Proteinphosphorylierung hat aber auch etwas mit der Insulinbiosynthese zu tun. Neben der Wirkung auf den Glucosestoffwechsel führen Glucose und bestimmte Hormone wie z.B. Glucagon und Isoproterenol zur Zunahme von cAMP in der ß-Zelle. Letzteres bewirkt ebenfalls eine Proteinphosphorylierung und trägt auf diese Weise zum Sekretionsmechanismus bei. Darüberhinaus wird der Sekretionsmechanismus aber auch durch cAMP hervorgerufene Calciumtranslokation stimuliert (Brisson et al., 1972; Sugden und Ashcroft, 1978; Hellman et al., 1981). Auf der Abb. 2 ist die Rolle des Glucosemetabolismus für die Zunahme der Calciumkonzentration in der ß-Zelle näher dargestellt. Bei einem Anstieg der Glucosekonzentration kommt es über deren verstärkten Metabolismus unter anderem zur Zunahme der Konzentration reduzierter Pyridinnukleotide, in unserem Falle des NADPH. Nach der Auffassung von Ashcroft und anderen (Henquin, 1980) geht ein erhöhter Redoxzustand

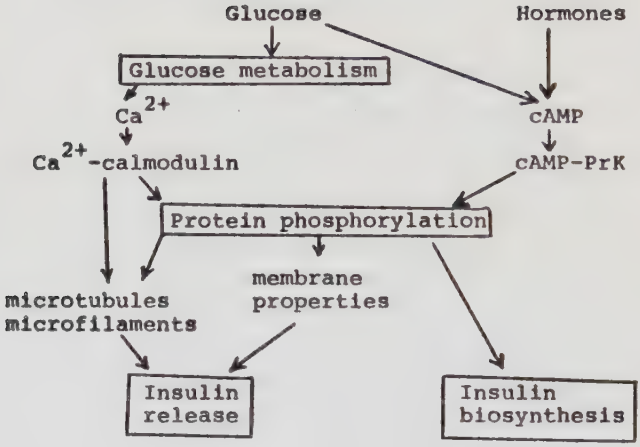


Abb. 1: Schematische Darstellung der möglichen regulatorisch Ereignisse bei der durch Glucose induzierten Sekreti und Biosynthese von Insulin (nach Ashcroft, 1980).

reduzierter Pyridinnukleotide mit einer Hemmung des Kalziumausstromes aus der ß-Zelle einher. Der Kalziumausstrom ist normalerweise bei dieser Zellart für die Aufrechtherhöhung des elektrischen Ruhepotentials verantwortlich. Hemmung des Kalziumausstroms führt daher zur Membrandepolarisation und zur elektrischen Aktivität. (Dies steht bei der Insel im Gegensatz zu anderen Geweben, z.B. Nervengewebe). Mit der elektrischen Aktivität kommt es zum Einstrom von Calciumionen durch den voltabhängigen Calciumkanal, was zur Zunahme seiner Konzentration im Cytoplasma führt. Der Glucosemetabolismus liefert auf seinem Weg durch die anaerobe Glycolyse Phosphoenolpyruvat, dessen Konzentration mit Erhöhung der Glucosemenge ansteigt. Phosphoenolpyruvat wirkt seinerseits auf Mitochondrien im Sinne einer Hemmung der Calciumaufnahme. Auf diese Weise kommt es schließlich auch zum Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol. Die weiteren Schritte, die letztlich zur Exozytose führten, wurden bereits im Zusammenhang mit der Abb. 1 diskutiert.

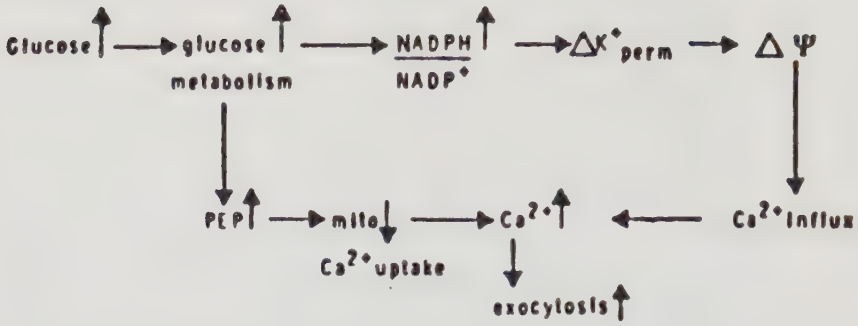


Abb. 2: Hypothetisches Modell der Stoffwechselereignisse, die zum "stimulus-secretion coupling" in der ß-Zelle führen. Nach Ashcroft (1980) führt die Steigerung der Glucosekonzentration über zwei Wege zur Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration: 1. über die Steigerung des Phosphoenolpyruvates und Hemmung der Calciumaufnahme in die Mitochondrien und 2. über eine vermehrte Calciumaufnahme durch die Cytoplasmamembran nach deren Depolarisation. Die Folge der gesteigerten Calciumkonzentration im Plasma ist die Exocytose.

Daß die Glucose-induzierte Sekretion von Insulin stark vom NADPH/NADP-Quotienten abhängt, wurde in den letzteren Jahren u.a. von Ammon et al. (Ammon, 1973; Ammon und Verspohl 1976 & 1979; Ammon et al., 1977; 1979a & b) und von Malaisse et al. (Malaisse et al., 1979a & b) gezeigt. NADPH stellt jedoch lediglich ein reduzierendes Coenzym dar, das für eine Reihe von Reduktionsschritten in Zellen benötigt wird. Es ist unwahrscheinlich, daß NADPH ausgerechnet in der ß-Zelle die selektive Aufgabe haben sollte, den Kalziumausstrom zu regulieren. Ähnlich wie in anderen Geweben ist es vielmehr denkbar, daß das NADPH lediglich den Wasserstoff für bestimmte Reduktionsvorgänge liefert, so z.B. die Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG). Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutathionreduktase (GR), einem Flavoprotein, wie folgt katalysiert (Rall und Lehninger, 1952):

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Es ist daher möglich, daß für die Sekretion von Insulin nicht das NADPH per se, sondern z.B. seine reduzierende Wirkung auf das Glutathionsystem im Zusammenhang mit der Sekretion von Insulin steht.

1.1.2. Rolle von Thiolen bei der Sekretion von Insulin

In der Tat haben sich in den letzten Jahren die Hinweise verdichtet, nach denen der Redoxstatus des GSH/GSSG Systems eine Rolle bei der Regulation der Empfindlichkeit der ß-Zelle gegenüber einigen Stimulatoren der Insulinsekretion wie Glucose, Tolbutamid, Leucin und p-Chloromercuribenzoat (Ammon et al., 1977; 1979a & b; Hellmann et al., 1973; 1975a & b; 1976) spielt. Bloom et al. (1972) haben berichtet, daß Thiol-Reagenzien, wie z.B. p-Chloromercuribenzoat sehr rasch die Insulinsekretion stimulieren. Da sie aber nur sehr langsam in die Zelle permeieren, lag die Vermutung nahe, daß der Effekt auf Reaktionen an mem-

branständigen SH-Gruppen beruht. Daß diese wiederum mit GSH in der Zelle in Verbindung stehen, und GSH für den Thiol-Disulfid-Austausch von Bedeutung sein könnte, ist zumindest für Erythrocyten und Leberzellen wahrscheinlich gemacht worden (Rink, 1974; Isaacs und Binkley, 1977).

Zur Frage, ob und in welcher Weise auch dem reduzierten Glutathion eine Rolle im Mechanismus der Insulinfreisetzung zukommt, ist bisher allerdings nur wenig bekannt. Der Beantwortung dieser Frage kann dadurch nähergekommen werden, daß man mit Hilfe von metabolischen Hemmstoffen die Konzentration von NADPH und GSH senkt und nun untersucht, ob unter dieser Bedingung noch eine Stimulierung der Insulinsekretion möglich ist. Um dies zu prüfen, haben Ammon et al. (1977) mit dem t. BHP eine Substanz ausgewählt, die imstande ist, den intrazellulären Gehalt von Inseln an GSH zu vermindern (Ammon et al., 1979a). Hydroperoxide werden durch die Glutathionperoxidase in Gegenwart von GSH reduziert, GSH selbst wird dabei zu GSSG oxidiert. Demnach führt ein Überschuß an Hydroperoxiden in der Zelle zu einem GSH-Mangel. Nach Untersuchungen an Erythrocyten und Leberzellen von Srivastava und Sies (Srivastava et al., 1974; Sies et al., 1972) fungiert t-BHP als Substrat der Glutathionperoxidase und führt dadurch reduziertes GSH in oxidiertes GSSG über:

$$(CH_3)_3\,C\text{-}O\text{-}OH \;+\; 2GSH \xrightarrow[\text{Peroxidase}]{\text{Glutathione}} (CH_3)_3\text{-}C\text{-}OH + GSSG + H_2O$$

Auch bei Anwesenheit von t-BHP wird sowohl der GSH/GSSG-Quotient der Pankreasinsel gesenkt (Ammon et al., 1979a), als auch die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose gehemmt (Ammon et al., 1977).

Ähnliche Befunde wurden mit dem Diamid, einer Substanz, die imstande ist, den intrazellulären Gehalt von Gewebe an GSH zu vermindern (Kosower et al., 1969) erhoben. Diamid oxidiert sehr schnell das intrazelluläre GSH von Ery-

throcyten (Kosower et al., 1972) und von Inseln (Ammon et al., 1979a) nach folgender Reaktion:

$$(CH_3)_2NCON{=}NCON(CH_3)_2 + 2GSH \longrightarrow (CH_3)_2NCONHNHCON(CH_3)_2 + GS$$

Diamid kann, wie dies an anderen Geweben, wie Erythrocyten (Kosower et al, 1972) gezeigt worden ist, schnell Zellmembranen permeieren und mit GSH spezifisch und schneller als mit anderen Molekülen in der Zelle reagieren. Was die Pankreasinsel betrifft, so konnte in unserem Labor gezeigt werden, daß sowohl den GSH/GSSG-Quotienten, als auch die durch Glucose und andere Stimulantien hervorgerufene Insulinsekretion senkt (Ammon et al., 1977; 1979a).

An den isolierten Sekretionsgranula von Fischinseln fanden Watkins und Moore (1974) eine Steigerung der Insulinfreisetzung mit SH-Reagentien, genauso Hellman et al., (1973 und 1974) und Bloom et al., (1972) an der isolierten Pankreasinsel der Dickmaus. Schließlich fanden Erlichman et al. (1979) am Hamster Insulinomzellen ebenfalls eine Steigerung der Insulinsekretion nach Gabe von SH-Reagentien, die die Zellmembran nicht permeiren (ähnlich wie p-CMB). Die Hormonfreisetzung durch diese Stoffe ist jedoch abhängig vom Vorhandensein eines Stimulators der Sekretion von Insulin wie z.B. Glucose und Tolbutamid im Inkubationsmedium. Auch bei anderen sekretorischen Zellen scheint es, daß Thiolgruppen auf der Zelloberfläche in Sekretionsgranula eine regulatorische Rolle bei der Freisetzung von Polypeptidhormonen spielen. So führen bei der isolierten Neurohypophyse SH-Reagenzien zur Freisetzung von Vasopressin (Douglas et al., 1965) und bei der Adenohypophyse des Rindes zur Freisetzung von somatotropem Hormon (Schofield, 1971).

1.1.3. Glucosemetabolismus und Thiolgruppen

Denkt man an die Glucose als wichtigsten physiologischen Stimulus und an die Tatsache, daß für die Sekretion von Insulin auf Glucosereiz ein Glucosestoffwechsel stattfinden muß (Matschinsky und Ellermann, 1968), so muß die Frage nach dem physiologischen Zusammenhang zwischen Glucosemetabolismus und Thiolgruppen der Membran gestellt werden. Aus dem Stoffwechsel stammt zunächst die Energie für die Exocytose. Darüberhinaus stellt der Glucoseabbau reduzierte Pyridinnukleotide zur Verfügung. Eine Steigerung der reduzierten Pyridinnukleotide geht auch mit der Insulinsekretion einher, die auf Glucosereiz oder ∝-Ketoisocarpronsäurereiz oder nach L-Leucin-Gabe stattfindet (Panten et al., 1973; 1974). Wird die Insulinsekretion durch Hemmstoffe wie Menadion (Malaisse et al., 1978a), NH_4^+ (Sener et al., 1978) und Methylenblau (Ammon et al., 1977) gehemmt, sinkt auch die Konzentration der reduzierten Pyridinnukleotide. Um nun die intrazelluläre Verteilung dieser Pyridinnukleotide und ihre Trennung in NADPH/NADP- und NADH/NAD-Anteile zu ermöglichen, wurde sowohl die Substratmenge als auch das entstandene Produkt einer pyridinnukleotidkatalysierten Dehydrogenase bestimmt und die jeweiligen Pyridinnukleotidquotienten berechnet (nach Veech et al., 1969). Dabei wurde festgestellt, daß die freie cytosolische NADPH/NADP-Ratio nach Steigerung der Glucose-Konzentration von 2 auf 2o mM wesentlich mehr anstieg als das Gesamtnukleotidverhältnis. Daraus läßt sich eine wichtige Rolle dieses Redoxpaars NADPH/NADP im Cytoplasma für die Glucose induzierte Insulinsekretion herleiten (Ammon und Verspohl, 1976; Sener et al., 1978; Malaisse et al., 1979a & b ; Ashcroft, Rev. 1980).

Das NADPH wird zum Teil beim Abbau der Glucose im Pentose phosphatshunt gebildet. Daraus schließen Verspohl et al., (1979), daß dem Glucosemetabolismus über diesen Stoffwechselweg eine wichtige Rolle im Mechanismus der glucose-

induzierten Insulinsekretion zukommt, da die Aktivität des PPS einer bei Steigerung der Glucosekonzentration zunimmt.

1.1.4. Allgemeine Bedeutung vom GSH für die Zellstoffwechsel

Dem Tripeptid Glutathion kommt im Zellstoffwechsel eine zentrale Stellung zu. Seine physiologische Bedeutung beruht in erster Linie auf seiner Eigenschaft als Redox-System, das nach dem Prinzip der reversiblen Bindung zweier Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke arbeitet. Durch Oxidation entstehendes GSSG wird laufend wieder enzymatisch reduziert, dadurch wird ständig ein bestimmter GSH/GSSG-Quotient der Zelle aufrechterhalten. Von diesem Thiol-Disulfid-Status sind viele Stoffwechselschritte abhängig. So wird die Aktivität von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels über die Bildung von gemischten Disulfiden mit niedermolekularen Thiolen (GSH) beeinflußt (Mannervik und Eriksson, 1974; Kosower und Kosower, 1976). Von verschiedener Seite wurde berichtet, daß ein veränderter Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems veränderte Membraneigenschaften zur Folge hat: So werden u.a. der Transport von Ionen durch Membranen (Epstein, 1971), die Freisetzung lysosomaler Enzyme (Malbica, 1971), und die Funktion der Mitochondrienmembranen (Siliprandi et al., 1974) durch den GSH/GSSG-Quotienten beeinflußt. Wird das GSH/GSSG-Gleichgewicht zur oxidierten Seite hin verschoben, so sind Membranschäden, vor allem infolge nicht mehr eliminierter Peroxide (GSH fungiert als Substrat der Glutathionperoxidase), die Folge (Allen und Jandl, 1961). Im Zellstoffwechsel ist der Redoxstatus des Thiol-Disulfidsystemseng mit dem Metabolismus verknüpft und zwar nach folgendem Schema (Jocelyn, 1972):

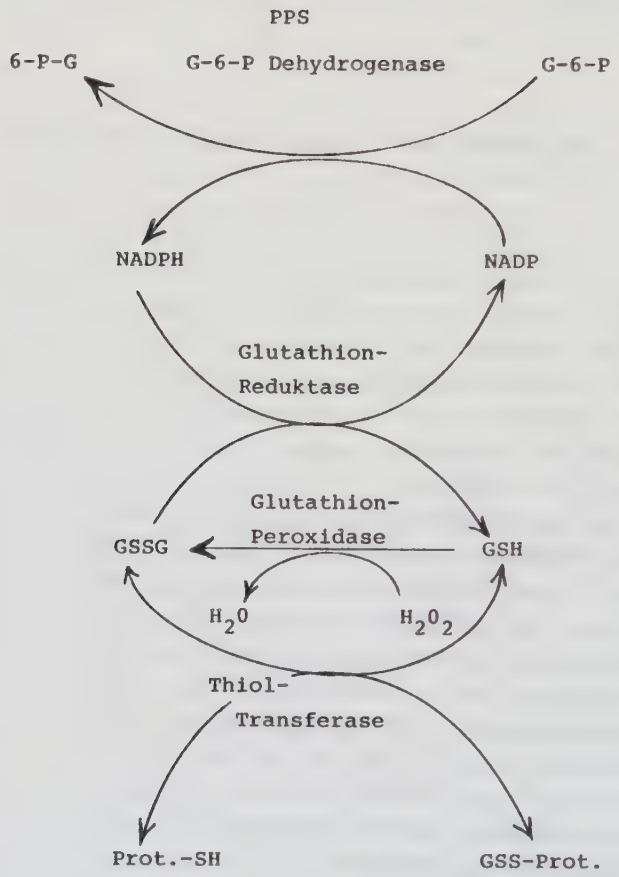
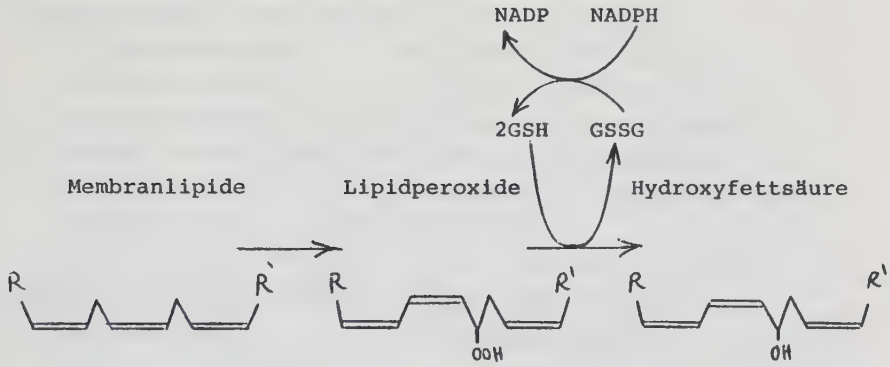


Abb. (3) Beziehungen zwischen GSH, GSSG, gemischten Disulfiden mit Membran- oder Enzym-Proteinen und dem NADPH-bildenden System im Zellstoffwechsel (nach Isaac und Binkley, 1977). Prot.-SH : Protein SH-Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen gemischte Disulfide bilden können und möglicherweise im Metabolismus regulatorische Funktion ausüben.

Von Kosower et al. wurde ein Modell postuliert, wie durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktion die Aktivität eines Enzyms reguliert werden kann (Kosower und Kosower, 1976).

Die physiologische Aufgabe der Glutathion-Peroxidase ist es wahrscheinlich, intrazellulär anfallendes H_2O_2 und durch Lipidperoxidation entstandene Lipidperoxide nach folgendem Schema zu reduzieren (Günzler, 1974)



Bemerkenswert ist dabei die hohe Spezifität des Enzyms für das Donorsubstrat GSH und die geringe Spezifität für das Akzeptorsubstrat, weshalb angenommen werden kann, daß intrazellulär nur GSH oxidiert wird und andere Thiole wie Cystein nicht umgesetzt werden (Flohé et al., 1971).

Auch beim Transport von Aminosäuren spielt Glutathion eine Rolle. Im γ-Glutamylzyklus werden Aminosäuren mit Hilfe der membranständigen γ-Glutamyltranspeptidase, deren Aktivität an den Stellen besonders hoch ist, an denen ein verstärkter Membrantransport vorliegt, über eine Translokationsreaktion in die Zelle aufgenommen (Meister, 1973). Durch das Thiolreagenz Diamid kann die Aufnahme von Aminosäuren gehemmt werden (Pillion et al., 1976). Eine wesentliche Funktion hat Glutathion auch bei Entgiftungsreaktion der Zelle. Epoxide werden mit GSH

in nicht toxische Derivate umgewandelt (Chasseaud, 1976). Die Reaktion elektrophiler Stoffe mit GSH führt unter Einfluß der GSH-S-Transferasen zu GSH-Konjugation, die entweder ausgeschieden oder zur Mercaptursäure metabolisiert werden (Wendel, 1978). Radikale werden von Glutathion direkt abgefangen (Flohé und Günzler, 1976).

Schließlich soll die Beziehung zwischen Glutathion und der Neurotransmitterfreisetzung erwähnt werden. Werman et al. (1971) beobachteten bei neurophysiologischen Untersuchungen am Frosch nach Behandlung mit Diamid eine Zunahme des Endplattenpotentials. Als Mechanismus wird eine Disulfidbildung in der Membran angenommen, die zur Membrandkontraktion und somit zur Freisetzung von Neurotransmittern führt (Kosower, 1970; Kosower und Werman, 1971).

1.1.5. Thiol abhängige Stoffwechselvorgänge der Langerhansschen Inseln:

Es scheint ein allgemeines Phänomen zu sein, daß für die volle Aktivität regulatorischer Proteine wie Enzyme und Transportproteine die Integrität von Thiolgruppen gewährt sein muß. Zwischen der Modulation des Thiol-Redoxstatus von Langerhansschen Inseln und den metabolischen, kationischen Ereignissen, die schließlich zur Freisetzung von Insulin führen, wurde eine enge Korrelation beobachtet. Es wurde gezeigt, daß ein reduzierter Redoxstatus des GSH-GSSG Systems von Inseln von einer Abnahme der K^+-Permeabilität begleitet wird, während eine Verschiebung zu einem mehr oxidierten Zustand die K^+-Permeabilität erhöht. Diese Sichtweise kann gestützt werden durch die Beobachtungen, daß exogenes reduziertes Glutathion den $^{86}Rb^+$-Efflux vermindert, und daß t-Butylhydroperoxid diesen Efflux erhöht (Henquin, 1980). Der obengenannte Vorschlag wird weiterhin dadurch gestützt, daß Inselzellen

eine hohe Konzentration an Glutathion (Havu, 1969; und Grimm, 1978) besitzen. Die Änderungen des Thiol-Redoxstatus Langerhansscher Inseln könnten auch auf verschiedene Weise mit dem Ca^{2+}-Influx verknüpft sein. Von Hellmann et al. (1974) postuliert, daß der Transport von Ionen in die Zelle im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von SH-Gruppen in der Cytoplasmamembran steht. Andererseits kann das Ausmaß der Reduktion von SH-Gruppen in Membranproteinen, das durch das Redox-Quotient des Glutathionsystems beeinflußt wird, die Permeabilität der Zellmembran für K^+ bestimmen (Henquin, 1980). Besonders erwähnt werden muß, daß elektrophysiologische Daten und Messungen von K^+- oder Rb^+-Fluxen (Henquin, 1977, 1978; Henquin und Meissner, 1978; Matthews und Sakamoto, 1975; und Meissner, 1976) gut belegt haben, daß der Ca^{2+}-Influx durch einen potentialabhängigen Ca^{2+}-Kanal verläuft, der durch eine Abnahme der Membranpermeabilität für K^+ geöffnet wird.

In unserem Labor wurde der Zusammenhang zwischen intrazellulären Glutathionsystem, membranständigen Thiolen und der glucoseinduzierten Calciumaufnahme untersucht. Dazu wurde ein besonders geeigneter pharmakologischer Hilfsstoff eingesetzt, mit dem Kosower et al. (1974) an roten Blutzellen gearbeitet haben: Diazodicarbonsäure-N'-methylpiperazid (DIP). Dieses Thiol-Oxidans ist leicht membrangängig und oxidiert Glutathion in isolierten Langerhansschen Inseln von Ratten zu GSSG (Eujen, 1979). Wird diese Verbindung jedoch mit Methyljodid quarternisiert und so in sein Salz übergeführt, verliert es aufgrund seiner Polarität die Membrangängigkeit und kann nur noch extrazellulär erreichbare Thiole oxidieren. Der unterschiedliche Einfluß dieser beiden Stoffe auf die basale und die durch Glucose stimulierte Calciumaufnahme wurde untersucht. Durch DIP wurde die durch Glucose gesteigerte Aufnahme von ^{45}Ca dosisabhängig gesenkt. Dagegen führte DIP-Salz zu einer Steigerung der ^{45}Ca-Aufnahme (Hägele, 1981).

Eine Beteiligung des cAMP-Adenylatcyclase-Systems am Mechanismus der Insulinsekretion kann man heute als sicher annehmen (Ashroft, 1976; Cerasi und Grill, 1977; und Malaisse, 1975). Das Nukleotid cAMP wird allgemein als potenzierender Faktor in der Reihe der Ereignisse angesehen, die von der Identifizierung von Glucose, der wichtigste physiologische Stimulator der Insulinsekretion, über eine Veränderung von Ionenfluxen (Hellmann et al., 1981) zur Freisetzung von Insulin führen. Untersuchungen an Rattenleber-Plasmamembranen weisen darauf hin, daß die Aktivität der Adenylcyclase vom Redoxzustand der Thiole abhängt (Mavier und Hanoune, 1975; Storm und Dolginow, 1973; Storm und Gunsalus, 1974). In Ratten-Adipocyten wurde die Aktivität dieses Enzyms durch Thiol-Oxidantien inhibiert. Diese Inhibition wurde jedoch aufgehoben, wenn Thiole wie z.B. ß-Mecaptoethanol und reduziertes Glutathion zugegeben wurden (Mukherjee und Lynn, 1977; 1979). Ähnliche Beobachtungen wurden von der Adenylatcyclase-Aktivität von Nucleous caudatus von Rattenhirn berichtet (Baba et al., 1978).

Bezüglich isolierter Langerhansscher Inseln von Ratten wurde in unserem Labor gezeigt (Ammon et al., 1982b), daß die Bildung von Insel-cAMP nach Zusatz von Glucose und p-CMB vom Redoxstatus der Insel-Thiole abhängt. Da das Thiol-Oxidans Diamid weder die cAMP-Phosphodiesterase-Aktivitäten beeinflußte noch die durch Aminophyllin bei niedriger Glucosekonzentration induzierte Zunahme von cAMP inhibierte, wird die Möglichkeit diskutiert, daß in Langerhansschen Inseln eher die Bildung als die Hydrolyse von cAMP vom Redoxstatus der Inseln-Thiole abhängt (Ammon et al., 1982b).

1.2. Fragestellung:

1) Da nach dem bisherigen Stand der Kenntnisse zu vermuten war, daß zumindest ein Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Redoxsystem von Thiolgruppen Langerhansscher Inseln und der durch Glucose, Tolbutamid, Leucin, p-CMB hervorgerufene Insulinsekretion bestand, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die insulinsekretionssteigernde Wirkung von Glucose und Tolbutamid durch den Einfluß von außen zugeführter Thiole z.B. reduziertes Glutathion und Cystein, in einem Perfusionssystem, steigern läßt und ob insbesondere bereits die Zufuhr von Thiolen allein zu einer Sekretion von Insulin führt.

2) Die Sekretion von Insulin kann durch eine Reihe von Stoffen stimuliert werden wie z.B. Kohlenhydraten, Aminosäuren, Hormonen, Sulfonylharnstoffen und Fettsäuren etc. Da anzunehmen ist, daß der Mechanismus der Insulin freisetzenden Wirkung dieser Stoffe untereinander doch sehr verschieden ist, ist denkbar, daß auch ihre Thiolabhängigkeit unterschiedlich ist. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob auch andere Stoffe als Glucose wie z.B. Fructose, Mannose, Glycerinaldehyd, Arginin, Leucin, Tolbutamid, Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP, die zu einer Sekretion von Insulin führen, thiolabhängig sind oder ob dieses Phänomen nur auf einen Teil der Stimulatoren der Sekretion von Insulin zutrifft.

3) Da SH-Gruppen, wie vorher dargestellt, offensichtlich für den Mechanismus der durch Glucose hervorgerufene Insulinsekretion von Bedeutung sind, sollte anschließend untersucht werden, ob sich die Zunahme von cAMP, ausgelöst durch Glucose, in Gegenwart von reduziertem Glutathion steigern läßt.

2. METHODIK

Für die folgenden Untersuchungen wurde sowohl die Technik des isoliert-perfundierten Pankreas verwendet, die sich besonders gut zum Studium der Dynamik der Insulinsekretion eignet und den Verhältnissen in vivo relativ nahekommt, als auch das Modell der isolierten Langerhans'schen Inseln. An letzterem lassen sich besonders Stoffwechseluntersuchungen durchführen, da das Gewebe nach in vitro-Behandlungen sofort biochemischen Untersuchungsmethoden zugängig ist.

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten von 200 - 300 g Körpergewicht beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24 und 26°C und 55 - 65 % relativer Luftfeuchtigkeit im 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2 Geräte

Automatischer Gamma-Zähler 4233	Nuclear Chicago Corp., USA
Eppendorf-Mischer Nr. 5432	Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hintz GmbH, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr. 3810	Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hintz GmbH, Hamburg
Laborzentrifuge UJ II KS	Heraeus Christ GmbH

Ph-Meter H 5	Beckman Instruments GmbH, München
Rührstab Nr. 3351	Lippendorf Gerätebau, Netheler und Hintz GmbH, Hamburg
Schüttelwasserbad	Köttermann KG, Hänigsen
Stereomikroskop SM 6	Nikon, Japan
Tischcomputer Olivetti P 602	Olivetti GmbH
Vortex-Genie Whirlmix	Wilten und Co.,Etten-Leur, Holland

Perfusionsapparatur

Abb. 4 zeigt ein Schema der Perfusionsapparatur; dabei handelt es sich um ein offenes Kreissystem ohne Recycling. Das gesamte Perfusionssystem befindet sich in einer thermostatisierten Kammer. Getrennt voneinander können zwei verschiedene Perfusionslösungen angeboten werden. Aus ihren Gefäßen werden die Perfusionslösungen mit Hilfe einer Pumpe zu je einem Oxygenator geleitet, hier mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) angereichert und mit derselben Pumpe zum eigentlichen Perfusionsgerät weitertransportiert. Auf diesem Weg ist ein Dreiwegehahn eingebaut, um die jeweils gewünschte Perfusionslösung einfließen zu lassen.

Hat das Perfusionsmedium den Dreiwegehahn passiert, fließt es durch eine Spirale, die sich in einem mit Wasser temperierten Gefäß befindet. Das auf 37° C thermostatisierte Gefäß dient gleichzeitig als wärmende Unterlage für das Pankreaspräparat. Nach Austritt des Perfusionsmediums aus diesem Gefäß gelangt es zur Kanüle, an welche die Arteria coeliaca angeschlossen ist. Kurz vor dieser Kanüle ist im Seitenschluß ein offenes langes Glasrohr angeschlossen,

das als Manometer dient und den Druck im Pankreaspräparat anzeigt. Der Abfluß des Perfusionsmediums erfolgt durch die Vena portae über eine weitere Kanüle, die die Verbindung zu einem Fraktionssammler herstellt. Dieser steht außerhalb der thermostatisierten Kammer.

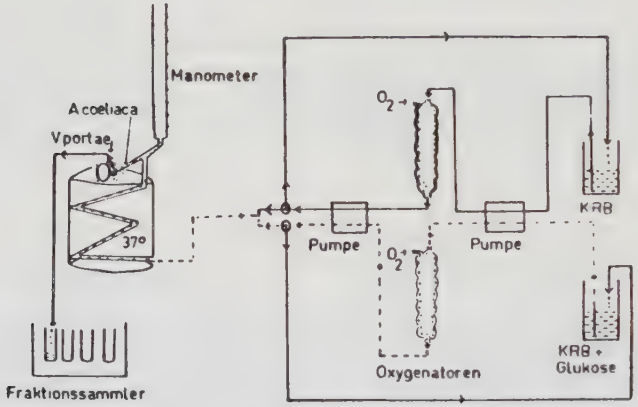


Abb. 4: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur für das isolierte Pankreas

2.3. Chemikalien und Enzyme:

Adenosin-3':5'-monophosphorsäure, cyclisch (A-3':5'-MP)	Boehringer, Mannheim
L-Arginin.HCl	Serva, Heidelberg
tert. Butylhydroperoxid	Merck-Schuchardt, München
Collagenase	Worthington Biochem. Corp., Freehold, USA

Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit	New England Nuclear, Boston, USA
Dextran (MG 60.000 - 90.000)	Serva, Heidelberg
N^6,O^2-dibutyryl-adenosin-3':5'-monophosphat, cyclisch, Na-Salz	Serva, Heidelberg
ß-D-Fructose	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA
∝-D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glutathion (reduziert)	Boehringer, Mannheim
D(+)-Glycerinaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
Insulin Radioimmunoassay Kit (INSIK-1$^{(R)}$)	CIS-SORIN, Italien (geliefert durch Isotopendienst West, Sprendlingen)
Isoprenalin Sulfat	Boehringer, Ingelheim
L-Leucin	Serva, Heidelberg
D(+)-Mannose	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Schweine-Glucagon, hochgereinigt	Novo Lab., Kopenhagen
Tolbutamid	Hoechst, Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethyl-diazindicarboxamid (Diamid)	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Fa. HAG AG, Bremen

Alle nicht genannten Chemikalien wurden in der jeweils reinsten Form (p.a.) von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2.4. Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1. Hanks' Lösung (Hanks und Wallace, 1949)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,85 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser 1 + 9 verdünnt, mit 0,6 mg/ml Glucose versetzt und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB-Lösung setzt sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al.(1972) folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung:	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung:	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung:	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung:	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung:	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung:	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch bereiten zu können, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A:

NaCl	69,20 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,93 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$	21,10 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Lösung C:

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	3,73 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Zum Gebrauch stellte man folgende Mischung her:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese KRB-Lösung wurde 60 Minuten mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast. Dann erfolgte Zugabe von 2 % Rinderserumalbumin und Einstellung des pH auf 7,35. Damit stand die KRB-Lösung für Inkubationszwecke zur Verfügung, es mußte nun noch die jeweils im Medium gewünschte Substanz zugesetzt werden.

2.4.3 Perfusionslösungen:

Als Perfusionsmedium wurde die obengenannte KRB-Lösung als Grundlage benutzt. Für zwei Perfusionen, die hintereinander durchgeführt werden, wurden ca. 850 ml Perfusionsmedium benötigt. Dieses setzt sich wie folgt zusammen:

KRB-Lösung "A" (siehe Punkt 2.4.1)	85 ml
KRB-Lösung "B" " "	85 ml
Aqua Dest.	595 ml

Diese Lösung wurde auf ca. 40°C erwärmt und darin zuerst 34 g Dextran (=4 %) und dann 2,12 g Rinderserum-albumin (0,25 %) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure auf 7,35 eingestellt und 85 ml $CaCl_2$-Lösung (siehe KRB-Lösung "C") zugesetzt. Diese Lösung wurde durch Filterpapier (Nr. 595, Firma Schleicher & Schüll) abgenutscht. Von diesen 850 ml Perfusionsmedium wurden 350 ml zur "Präperfusion" verwendet und zu den restlichen 500 ml Flüssigkeit wurden folgende Stoffe zugesetzt (vgl. Perfusionsprotokoll):

1. l-D-Glucose	500 mg/500 ml	=	5,6 mM
	1000 mg/500 ml	=	11,1 mM
2. t-Butylhydro-peroxid	191,51 mg/850 ml	=	2,0 mM
3. L-Cystein	302,90 mg/500 ml	=	5,0 mM
4. Gluthation (reduziert)	153,5 mg/500 ml	=	1,0 mM
5. Tolbutamid (5 %)	1 ml/500 ml	=	0,1 mg/ml
	2 ml/500 ml	=	0,2 mg/ml

Diese Substanzen wurden einzeln in Aqua dest. gelöst und in das Perfusionsmedium gemischt, der pH-Wert wieder auf 7,35 eingestellt.

2.4.3.1 Stabilität der untersuchten Thiolverbindungen in den Perfusionslösungen:

Die effektive Konzentration der zugesetzten Thiolverbindungen kann in albuminhaltigen Medien abnehmen. Deshalb wurden die Konzentrationsänderungen der Thiolverbindungen

in den Perfusionsmedien in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (siehe Abb. 5).
Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung, pH 7,4, mit oder ohne 2,5 mg Rinderserum-albumin pro ml wurde mit 1 mM reduziertem Glutathion oder 5 mM L-Cystein versetzt und bei 37°C mit O_2/CO_2 (95:5) begast. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden Proben entnommen, um die freien Thiolgruppen spektrophotometrisch mit Hilfe von DTNB (Ellmann, 1959) zu bestimmen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt in Prozent der Ausgangswerte der Absorption bei 412 nm. Die Daten lassen erkennen, daß während der ersten Stunde nach frischer Bereitung des Perfusionsmediums noch etwa 90 % des zugesetzten Thiols vorhanden sind, es aber danach rasch abnimmt. Es war deshalb erforderlich, für jedes Experiment frisch bereitete thiolhaltige Medien zu verwenden.

2.4.4 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2

Natriumacetat (wasserfrei)	2,05 g
Aqua bidest.	ad 500,00 ml

Mit 1 N - Essigsäure wurde pH 6,2 eingestellt.

2.4.5 Acetylierungsgemisch

Triaethylamin	2 Teile
Acetanhydrid	1 Teil

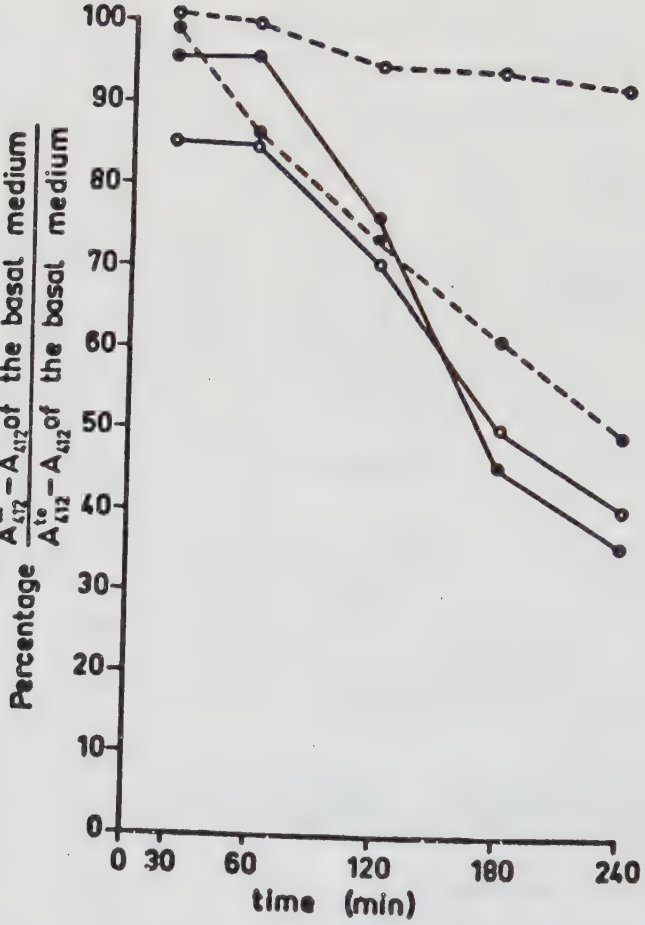


Abb. 5:

Änderungen der Konzentration zugesetzter Thiole im Perfusionsmedium in Abhängigkeit von der Zeit. Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4) mit (——) oder ohne (- - -) 2,5 mg BSA/ml wurde mit 1 mM reduziertem Glutathion (●) oder mit 5 mM L-Cystein (○) versetzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentzahlen der Absorption der Ausgangswerte bei 412 nm.

2.5 Experimenteller Teil

2.5.1 Isoliertes perfundiertes Rattenpankreas modifiziert nach Curry et al. (1968)

2.5.1.1 Operation:

200 - 300 g schwere Ratten wurden mit Hexobarbital-Natrium (14 mg/100 g) intraperitoneal narkotisiert. Die folgenden Operationsschritte wurden durchgeführt, um das Pankreas zu isolieren samt Milz, Magen und Duodenum (Abb. 6 a):

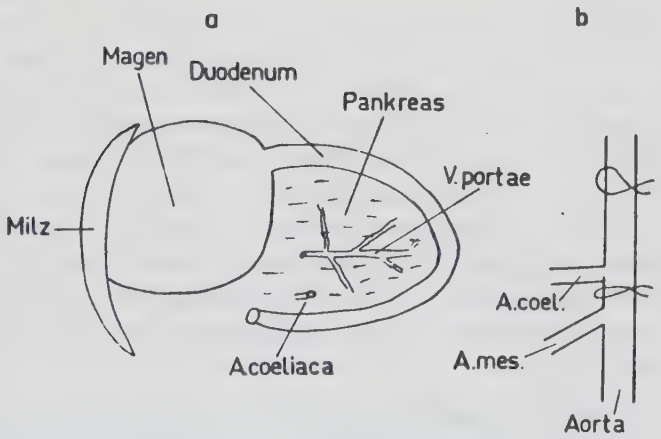


Abb. 6: a) Schematische Darstellung des isolierten Pankreas (einschließlich Milz, Magen und Duodenum mit Lage der Arteria coeliaca und Vena portae

b) Abgänge der Arteria coeliaca sowie der Arteria mesenterica von der Aorta

Durch einen Medianschnitt bis zum Brustbein wurde das Abdomen eröffnet und der gesamte Darm nach rechts gelegt. Nach Durchtrennen des Bindegewebes zwischen Duodenum und

Rectum wird die Arteria mesenterica sichtbar. Diese wird kurz nach der Abzweigung von der Aorta zweimal abgebunden und durchtrennt.

Das Rectum wird in der Nähe des Anus abgebunden und über dieser Stelle abgetrennt. Nun werden die Därme nach links gelegt, das Rectum ab dem Darmstumpf bis zum Beginn des Colons der Länge nach geöffnet und eventuell vorhandener Kot entfernt. Danach werden sämtliche Därme wieder nach rechts gelegt und einerseits zwischen dem Beginn des Colons und dem Ende des Rectums und andererseits zwischen dem Ileum und dem Duodenum durchschnitten.

Um Thrombenbildung zu vermeiden, werden in die Vena cava inferior 0,5 ml Heparin (5000 I.E. pro ml) injiziert. Nachdem sämtliche Leberbänder zwischen Magen und Leber durchtrennt sind, wird der Ösophagus sichtbar. Dieser wird ebenfalls abgebunden und durchschnitten. Das Bindegewebe zwischen Magen und Bauchinnenraum läßt sich durchtrennen, indem man den Magen hochhält. Jetzt können Magen, Milz und Duodenum samt Pankreas vorsichtig mit feuchten Tupfern nach links gelegt werden. Danach wird die Leber mit einem Haken hochgezogen. Um die Aorta freizupräparieren, wird das Bindegewebe in Höhe der Nierengefäße, unterhalb der Arteria mesenterica und oberhalb der Arteria coeliaca beseitigt.

Anschließend wird oberhalb der Arteria coeliaca an die Aorta eine Klemme angelegt. Der Leberhaken wird entfernt. Um die zu isolierenden Organe vom gesamten Blutkreislauf abzutrennen, wird zunächst einerseits die Vena hepatica portalis abgebunden und möglichst nahe der Leber durchtrennt und andererseits die Aorta zwischen Arteria mesenterica und Arteria coelica sowie unterhalb der Klemme durchschnitten (Abb. 6 b). Der Aortenstumpf wird längsseits geöffnet, hochgehalten und das gesamte Präparat freipräpariert.

In einer Petrischale wird das Präparat in eine Stellung

gebracht, die es bei der anschließenden Perfusion einnehmen sollte. Der Magen wird geöffnet, der Mageninhalt ausgepreßt und mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Dann wird das isolierte Pankreaspräparat in die Vertiefung des Glasgefäßes gelegt und zuerst die Arterie und dann die Vene an die jeweilige Kanüle angeschlossen.

2.5.1.2 Perfusionsprotokoll

Folgende Versuche wurden durchgeführt (siehe Abb. 12-18):

Nr.	Präperfusion	Perfusion
1		Glucose 2 mg/ml
2	t.BHP (2 mM)	Glucose 2 mg/ml + t.BHP (2 mM)
3		Glucose 2 mg/ml + GSH (1 mM)
4		Glucose 2 mg/ml + L-Cystein (5 mM)
5		Tolbutamid 0,2 mg/ml
6		Tolbutamid 0,2 mg/ml + GSH (1 mM)
7		Tolbutamid 0,2 mg/ml + L-Cystein (5 mM)
8		Tolbutamid 0,1 mg/ml + Glucose 1 mg/ml
9		Tolbutamid 0,1 mg/ml + Glucose 1 mg/ml + GSH (1 mM)
10		Tolbutamid 0,1 mg/ml + Glucose 1 mg/ml + L-Cystein (5 mM)
11		Glucose 1 mg/ml
12		Glucose 1 mg/ml + GSH (1 mM)
13		Glucose 1 mg/ml + L-Cystein (5 mM)
14		GSH (1 mM)
15		L-Cystein (5 mM)

-5 0 + 30

Perfusionszeit, Minuten

2.5.1.3 Durchführung der Perfusion:

Zuerst wurden alle Perfusionslösungen vorbereitet und die Apparatur auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft. Dazu gehört, daß alle Schläuche richtig angeschlossen sind, daß sich keine Luftblasen darin befinden und daß die Zugabe an Carbogen-Gas einreguliert wird. Danach wird mit der Operation der narkotisierten Ratte begonnen und das Pankreas entnommen.

Das Pankreaspräparat wird in die Vertiefung des Glasgefäßes gelegt, die Pumpe für die Perfusionslösung wird abgestellt und zuerst die Arterie und dann die Vene an die jeweilige Kanüle angeschlossen.

Jetzt wird die Pumpe mit der kleinsten Umlaufgeschwindigkeit wieder in Gang gesetzt und geprüft, ob das Perfusionsmedium aus der Vene fließt. Sollte dies nicht der Fall sein, wird versucht, mit einer Spritze Perfusionsmedium über die Kanüle anzusaugen bzw. das isolierte Pankreas in verschiedene Lagen zu drehen, um so den Durchfluß zu erleichtern.

Um ein Austrocknen zu vermeiden, wird das Pankreaspräparat mit feuchten Tupfern abgedeckt. Die Drehzahl der Pumpe soweit erhöht, daß 5 ml/min durch das Präparat fließen. Jetzt kann der Abflußschlauch an den Probenwechsler angeschlossen werden. Der eigentlichen Perfusion werden 15 Minuten zur Äquilibrierung vorgeschaltet. Danach folgt eine fünfminütige Präperfusion (prästimulatorische Phase), in den Abbildungen mit -5 bis 0 Minuten eingezeichnet. Während dieses Zeitraumes wird das Effluat einer Minute in Probengläschen gesammelt. Es dient zur Bestimmung der Basalsekretion von Insulin. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wird der Dreiwegehahn umgeschaltet, so daß nun das Testmedium zufließen kann. Während der ersten 7 Minuten wird das Effluat in Abständen von 30 Sekunden gesammelt. In den folgenden 25 Minuten werden Proben nach jeweils einer Minute abgenommen. Somit stellt der Zeitraum zwischen -5 und 0 Minuten die vorstimulatorische

Phase dar, und zwischen 0 und 30 Minuten die stimulatorische Phase.

2.5.2 Insulin-Bestimmung

a) Durchführung.

Die Insulinkonzentration im Effluat des perfundierten Pankreas wurde in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay (Doppel-Antikörper-Methode) gemessen (Soeldner und Slone, 1965). Die Bestimmung wurde mit dem Radioimmunoassay Kit (INSIK-1^{R}) durchgeführt. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Ratteninsulin verwendet. 10 µl der Proben sowie der Standardinsulinlösungen wurden in Polystyrol-Teströhrchen 1:10 mit Puffer folgender Zusammensetzung einpipettiert:

Puffer:

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	550 mg
Rinderalbumin	1,0 g

Aqua dest. ad 100,0 ml, pH 7,4 eingestellt.

Als "Leerwert" wurden 100 µl Puffer vorgelegt. Danach wurde der lyophilisierte Antikörperkomplex nach Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl davon den Proben zugesetzt. Die gesamten Proben wurden gut geschüttelt und 6 Stunden bei + 4° C im Kühlschrank stehen gelassen. Nach diesem Zeitpunkt wurde das Jod-125-markierte Insulin nach Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl dieser Lösung auf die Proben gegeben. Dieser Ansatz wurde wiederum 18 Stunden bei 4° C im Kühlschrank stehen gelassen. Nun wurde zu allen Proben je 1 ml kalter Puffer einpipettiert (Zusammensetzung siehe oben) und diese dann 20 Minuten lang mit 3 500 U/min bei + 4° C zentrifugiert (Laborzentrifuge UJIIKS). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand sofort abgekippt und die Zentrifugenröhrchen umgekehrt aufgestellt und eventuelle Tropfen, die am oberen Rand hängen, wurden entfernt. Anschließend wurden die Proben in einem automatischen -Zähler (Nuclear Chicago) 1 Minute lang gemessen.

b) Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf den Radioimmunoassay:

Da Thiole die Disulfidbrücken von Insulin angreifen und damit zu einer Unterbestimmung der freigesetzten Insulinmengen führen können, wurde der Effekt von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die Eichkurven des Insulin-Radioimmunoassays untersucht. Abb. 7 zeigt diesen Effekt. Standard-Ratteninsulin (4 000 uU/ml) in einem Medium mit 1 mM GSH oder 5 mM L-Cystein wurde etwa 48 Stunden bei - 20° C gelagert, danach wurde daraus eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 62,5 uU/ml, 125 uU/ml, ... etc. hergestellt. Anschließend wurden Radioimmunoassays mit der Doppel-Antikörper-Methode (Soeldner und Slone, 1965) durchgeführt. Aus den Daten ergibt sich, daß zwar die Eichkurven der Insulin-Radioimmunoassays durch 1 mM GSH oder 5 mM L-Cystein nach unten verschoben werden, daß jedoch die Linearität der Eichkurven durch die zugesetzten Thiolverbindungen bei den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflußt wird.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Kontrollversuche wurden in allen Experimenten die Proben aus der Perfusion bei - 20° C parallel mit anderen Röhrchen gelagert, die anstatt Perfusat Standard-Ratteninsulin (4 000 uU/ml) im selben Medium mit derselben Konzentration des untersuchten Thiols enthielten. Diese Standard-Ratteninsulin-Mischungen wurden während der Perfusion hergestellt. Das Insulin in den Perfusatproben wurde mit der Doppel-Antikörper-Methode bestimmt und die parallel bereitete Standard-Ratteninsulinlösung für die Erstellung der zugehörigen Eichkurve benutzt. Die Berechnung erfolgte wie bei 2.5.5 beschrieben.

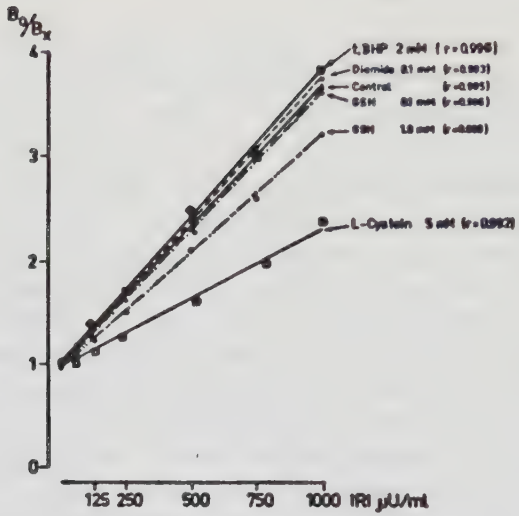


Abb. 7:

Einfluß von Thiolen und Thiolreagenzien auf die Eichkurven des Insulin-Radio-immunoassays.

B_o = gebundene Radioaktivität von markierten Insulin bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin.

B_x = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Insulins.

2.5.3 Isolierte Langerhans'sche Inseln nach Lacy und Kostianovsky (1967)

Die Ratte wurde mit Äther narkotisiert, das Abdomen durch einen Schnitt bis zum Brustbein und durch Querschnitte an den beiden Rippenbögen geöffnet. Unter den Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen und um ihn zur Leber hin abbinden zu können. Nach Abklemmen des Duodenum zum Magen hin wurden durch den Ductus pancreaticus 10 ml eisgekühlte Hank's Lösung in das Pankreas injiziert. Das nun gut sichtbare Pankreas wurde mit einer Schere von Magen, Leber, Milz und Darm ab- und herausgetrennt und in eine Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung gelegt. Dort wurden sämtliche noch vorhandenen Fettpartikel entfernt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Pankreas mit einer kleinen Schere in möglichst gleichmäßige kleine Teilchen, die sich durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze aufsaugen ließen. Mit Hanks' Lösung wurde das Volumen in der Spritze auf 5 ml ergänzt, anschließend gab man den gesamten Inhalt zu 30 mg Collagenase, die sich in einem 20 ml-Schnappdeckelglas befanden. Bei 37° C ließ man die Collagenase in einem Schüttelwasserbad unter kräftigem Schütteln so lange auf die Pankreasteilchen einwirken, bis eine homogene, hellbraune, schleimige Flüssigkeit entstanden war. Dies dauerte je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pankreaspartikel 5 bis 10 Minuten.

Die Flüssigkeit wurde in einem Becherglas 3 mal durch den Konus der 5 ml-Rekordspritze zur weiteren Zerkleinerung größerer Partikel gezogen und dann durch ein Plastikteesieb in einen mit etwa 15 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllten 25 ml-Meßzylinder gegeben. Auf diese Weise wurde die Collagenase-Reaktion abgestoppt.

Die Suspension schüttelte man kräftig durch und ließ sie dann zum Absitzen der Teilchen stehen. Exokrine Partikel und Langerhans'sche Inseln haben ein unterschiedliches

spezifisches Gewicht und damit eine unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit. Durch Absaugen des Überstandes und erneutes Aufschwemmen war es möglich, exokrine Partikel und Langerhans'sche Inseln zu trennen. Dieser Vorgang wurde etwa 8 mal wiederholt, die Inseln wurden unter einem Stereomikroskop mit Hilfe einer Mikropipette aussortiert.

Alle Arbeiten wurden bei 0° C ausgeführt.

2.5.3.1 Vorinkubation der Inseln

Die isolierten Inseln wurden in ein 5 ml-Gläschen gegeben, die hierbei überführte Hanks' Lösung wurde nach dem Absetzen der Inseln abgesaugt. Zu den Inseln gab man 2 ml KRB-Albumin-Lösung, die 0,6 mg/ml Glucose enthielt. Das Glas wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen begast und 30 Minuten bei 37° C im Schüttelwasserbad langsam geschüttelt. Diese Vorinkubation diente der Stoffwechselregenerierung der Inseln nach dem Isolierungsprozeß. Anschließend wurden die Inseln im Eisbad 3 mal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

2.5.3.2 Hauptinkubation der Inseln für Messung des c AMP Gehaltes

2.5.3.2.1 Äquilibrierungszeit

Da die eigentliche Inkubationszeit nur sehr kurz war, mußte vorher der Stoffwechselapparat der Inseln bei 37° C in einer Äquilibrierungsphase normalisiert werden.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml-Gläschen einsortiert und mit 1 ml KRB-Albumin-Lösung, die 1 mg/ml Glucose enthielt, versetzt. Bei 37° C wurden sie im Schüttelwasserbad unter Car-

bogen-Begasung 30 Minuten langsam (ca. 40 Bewegungen/min) geschüttelt.

2.5.3.2.2 Reaktionszeit

Als eigentliche Reaktionsphase wurde eine Inkubationszeit von 2,5 Minuten gewählt, da in unserem Labor bereits zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg der durch 3 mg/ml Glucose + 10 mM Aminophyllin stimulierten cAMP-Bildung zu erkennen war (Heinzl, 1979)

Auch andere Autoren fanden sowohl bei perfundierten (Charles et al., 1973; Grill und Cerasi, 1978 und Zawalich et al., 1975) als auch bei inkubierten Inseln (Claro et al., 1977; Cooper et al., 1973; Grill und Cerasi, 1974 und Schauder et al., 1977) das Maximum der intrainsulären cAMP-Konzentration nach 2 - 3 Minuten.

Den Inseln wurde nach der 30-minütigen Äquilibrierungszeit 1 ml des auf 37° C erwärmten Inkubationsmediums direkt im Wasserbad zugesetzt. Die hierbei erfolgende Verdünnung des Mediums wurde bei der Einwaage der jeweiligen Agentien berücksichtigt.

2.5.3.3 Aufarbeitung der inkubierten Inseln zur cAMP-Bestimmung

Da die Versuche unter den in unserem Labor üblichen Bedingungen durchgeführt wurden und 10 Inseln pro Ansatz inkubiert wurden, stand für die Bestimmung von cAMP nur sehr wenig Gewebe zur Verfügung. Die analytische Messung des cAMP-Gehaltes mußte also mit sehr empfindlichen Methoden erfolgen. Eine sehr häufig verwendete Methode für die Bestimmung von cAMP in Gewebe und biologischen Flüssigkeiten ist die Proteinbindungsmethode nach Gilmann 1970, deren unterste Erfassungsgrenze aber bei etwa 200 f mol cAMP liegt (Gilman und Murad, 1974).

Eine weitere Methode, die häufig speziell für die cAMP-Bestimmung bei Langerhans'schen Inseln verwendet wird, wurde von Grill und Cerasi (1974) entwickelt. Hierbei werden die Inseln mit ^{3}H-Adenin vorinkubiert, später wird das gebildete ^{3}H-cAMP gemessen. Pro Ansatz werden aber mindestens 15 - 25 Inseln benötigt (Grill und Cerasi, 1973, 1974). Auch ist dieses Verfahren methodisch recht aufwendig, da das gebildete ^{3}H-cAMP sehr sorgfältig von allen anderen radioaktiven Verunreinigungen abgetrennt werden muß.

Die empfindlichste Methode scheint der Radioimmunoassay zu sein, er erreicht mit einer modifizierten Methode eine Empfindlichkeit von etwa 3 fmol cAMP (Frandsen und Krishna, 1976). Der Radioimmunoassay wurde deshalb als Meßmethode ausgewählt. Um aber die radioimmunologische Bestimmung durchführen zu können, war es erforderlich, ein geeignetes Verfahren zur Aufarbeitung des Inselgewebes nach der Inkubation zu finden.

2.5.3.3.1 Gewebefixierung

Nach Robison et al. (1971) ist der kritische Schritt bei der cAMP-Bestimmung die Fixierung des Gewebes, d.h. die Blockierung sämtlicher Stoffwechselvorgänge. Diese Blockierung muß schnell und vollständig erfolgen, weil die Umsetzungsrate von cAMP im Gewebe sehr hoch ist. Erhöhte cAMP-Spiegel werden sehr schnell durch die cAMP-Phosphodiesterase wieder abgebaut (Robison et al., 1971 und Sutherland et al., 1968). Der kritische Zeitraum liegt für Hirn, Herz und Skeletmuskel bei etwa 1 bis 3 Sekunden, aber er könnte für andere Gewebe auch etwas länger sein (Mayer et al., 1974). Auch für den glucosestimulierten cAMP-Pool in Langerhansschen Inseln wurde ein sehr hoher Turnover beschrieben (Grill und Cerasi, 1976). Von vielen Autoren wird cAMP deshalb nun in Gegenwart von Phosphodiesterase-Hemmstoffen bestimmt (Claro et al., 1977;Grill und Cerasi, 1975 u. 1976;Kuo et al., 1974; Rabinovitch et al., 1976). Die Hemmwirkung von 0,1 mM Isobutylmethylxanthin in Langerhansschen Inseln hält allerdings auch nicht sehr lange an, bereits 90 Sekunden nach Entfernung des Stimulus waren die cAMP-Werte wieder abgefallen (Grill und Cerasi, 1974 u. 1976).

Eine unvollständige oder schlechte Fixierung führt nur zu falsch negativen Ergebnissen, falsch positive Ergebnisse wurden für diesen Fall nicht beobachtet (Robison et al., 1971).

Aus den verschiedenen Möglichkeiten der Reaktionsabstoppung wurde in unserem Labor eine Kombination aus Frierstopp und Säuredenaturierung ausgewählt (Heinzl, 1979).

Nach der 2,5-minütigen Reaktionszeit wurden vom Inkubationsmedium 1,8 ml abgesaugt, die Inseln rasch gezählt und mit 200 ul eiskalter TCA 5 % versetzt. Anschließend wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.5.3.3.2 Extraktion von cAMP aus denaturiertem Inselgewebe

Die eingefrorenen Proben wurden alle zusammen nach Beendigung der Inkubation im Wasserbad bei 40 - 50° C aufgetaut.

Anschließend wurde jede Probe 15 Sekunden auf dem Whirlmix auf höchste Stufe geschüttelt, um mit der sauren Lösung cAMP aus den zerstörten Inseln zu extrahieren (Schubart et al., 1977).

Nach Auftauen und Schütteln der Proben wurden ausgefälltes Protein und Gewebereste 20 Minuten bei 0° C mit 3 500 U/min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden je 250 ul abgenommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr. 3810 überführt und 3 mal mit je 750 ul wassergesättigtem Äther mit Hilfe des Eppendorf-Mischers Nr. 5432 je 2 Minuten ausgeschüttelt.

Nach Phasentrennung wurde Äther mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, der restliche Äther wurde durch 5-minütiges Erhitzen im Wasserbad auf 50 - 60° C entfernt.

2.5.3.3.3 Bestimmung des Restvolumens

Aufgrund der in unserem Labor üblichen Bedingungen wurden 10 Inseln in 2 ml Inkubationsmedium inkubiert. Nach der Inkubation wurden sofort etwa 1,8 ml Medium entfernt, da sonst bei Zerstörung der Inseln das intrainsuläre cAMP zu stark verdünnt worden wäre. Zur Entfernung des Mediums erwies sich folgende Methode am schnellsten und praktikabelsten:

Das Gläschen mit Inseln und Medium wurde nach der Reaktionszeit zwischen zwei weitere Gläschen, die je 200 ul Flüssigkeit enthielten, gestellt. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde das Medium im Probengläschen auf etwa 200 ul

abgesaugt, dazu gab man, nach raschem Zählen der Inseln, 200 ul eiskalte TCA 5 % und fror sofort in flüssigem Stickstoff ein. Da es aber unmöglich war, das Medium genau auf 200 ul abzunehmen, wurde nach dem Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins und der Gewebereste sowie nach Abnehmen von 250 ul Überstand das Restvolumen im Gläschen bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe einer 1 ml-Einmalspritze (Tuberkulinspritze), mit der Volumenunterschiede bis zu 5 µl gemessen werden konnten. Zum Vergleich wurden verschiedene Mengen (160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 µl) KRB-Albumin-Lösung gleich behandelt und davon ebenfalls das Restvolumen bestimmt. Mit Hilfe dieser Meßreihe konnte das Endvolumen der Proben berechnet werden.

2.5.3.4 Zusammenfassung der Aufarbeitungsmethode der Inseln für die cAMP-Bestimmung

Nachfolgendes Schema faßt die Methode zur Aufarbeitung der Inseln für die cAMP-Bestimmung zusammen.

Inkubation der Inseln
↓
Medium auf 200 µl absaugen
↓
Inseln zählen
↓
mit 200 µl eiskalter TCA 5 % versetzen
↓
in flüssigem Stickstoff einfrieren
↓
auftauen, jede Probe 15 Sekunden mixen
↓
zentrifugieren
↓
vom Überstand 250 µl abnehmen

3 mal mit 750 µl Äther ausschütteln — Restvolumen bestimmen

↓
auf 50-60° erhitzen
↓
Proben bei - 20° C einfrieren.

2.5.3.5 Radioimmunologische cAMP-Bestimmung mit dem Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit der Firma New England Nuclear (NEN-Kit)

Vom NEN-Kit wurden ScAMP-TME^{125}J, cAMP-Antikörper-Komplex, Kaninchen-Globulin, Natriumacetatpuffer, Triäthylamin und Acetanhydrid verwendet. Die Reagentien mußten teilweise vor der Verwendung noch mit Wasser gelöst oder verdünnt werden (NEN Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit).

Die aufgetauten Proben und Standards wurden acetyliert. Zur Acetylierung wurde frisch hergestelltes Acetylierungsgemisch verwendet, das aus 1 Teil Acetanhydrid und 2 Teilen Triäthylamin besteht. Davon wurden mit Hilfe einer Konstriktionspipette je 6 ul (2,5 ul/100 ul Probe) zu jeder Probe gegeben. Danach wurden die Proben sofort mit dem Whirlmix gemischt, weil Acetanhydrid innerhalb 30 Sekunden im wässrigen Milieu hydrolysiert wird und dann keine acetylierende Wirkung mehr entfalten kann. Die Acetylierungsreaktion läuft sofort nach Zugabe des Reaktionsgemisches ab, es entsteht ein einheitliches Produkt, das 2'O-Acetyl-cAMP (Frandsen und Krishna, 1976; Harper und Brooker, 1975). Je Probe wurden 2 ml 100 ul abgenommen und in ein Polypropylengläschen gegeben.

Gefriergetrocknetes Kaninchen-Serum wurde nach Vorschrift in Wasser gelöst und zu einer nach Vorschrift mit Wasser verdünnten Lösung von ScAMP-TME^{125}J gegeben (NEN Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit). Die so hergestellte Lösung enthielt in 11 ml 0,75 uCi ScAMP-TME^{125}J (spez. Aktivität 126,2 Ci/mmol), 1 % Kaninchen-Serum und 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2. Davon wurden zu jeder Probe 100 ul pipettiert. Anschließend wurde der gefriergetrocknete cAMP-Antikörperkomplex in Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt den Antikörperkomplex in 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2. Auch davon wurden zu jeder Probe 100 ul gegeben.

Alle Proben wurden mit Hilfe des Whirlmix gut gemischt und 16 bis 18 Stunden im Kühlschrank bei 2-4° C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml eiskaltem 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6,2 wurden die Proben 20 Minuten bei 0° C mit 3 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und eventuell am Röhrchen anhängende Tropfen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Die Radioaktivität des abzentrifugierten Niederschlages im Polypropylenröhrchen wurde im automatischen Gamma-Counter gezählt.

Die Berechnung erfolgte wie bei 2.5.5 beschrieben.

2.5.4 Hauptinkubation der Inseln für die Messung der Insulinsekretion aus isolierte Inseln

Die Hauptinkubation diente der Messung der Insulinfreisetzung unter Zusatz von Stimulatoren und Hemmstoff der Sekretion, wie dies später im Detail ausgeführt werden wird.

In Probengläschen von 2 ml Volumen wurden je 5 Inseln einsortiert, miteingeschleppte Flüssigkeit sorgsam unter dem Mikroskop abgesaugt und dabei die Inseln nochmals gezählt. Hierzu wurde je 1 ml Inkubationsmedium einpipettiert, das entweder nur aus KRB-Lösung bestand (=Puffer) oder Glucose in verschiedenen Konzentrationen enthielt, wie dies bei den einzelnen Untersuchungen angegeben werden wird. Befanden sich weitere Substanzen im Medium, wurden sie in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Alle Inkubationslösungen enthielten 2 % Rinderserumalbumin und waren auf 7,35 eingestellt. Jede Serie wurde bei 37° C unter Begasung mit Carbogen und langsamen Schütteln (Frequenz ca. 40 Bewegungen/Minute) inkubiert. Um die Sekretionsleistung der Inseln nach der gewünschten Zeit zu stoppen, wurden alle Gläschen sofort nach der Inkubation in Eiswasser gestellt - hier stellt die ß-Zelle ihre Sekretion ein - und jeweils

0,1 ml für die quantitative Bestimmung des sezernierten Insulins abgenommen und im Gefrierschrank bei Temperaturen unter - 25° C bis zur Insulinbestimmung aufbewahrt.

2.5.4.1 Wahl eines geeigneten Inkubationszeitraums

Lösungen von reduziertem Glutathion im Inkubationsmedium sind nur sehr kurze Zeit stabil. Es war daher zunächst notwendig, eine experimentelle Anordnung zu finden, mit der es gelang, die Inkubation mit GSH auf einen möglichst kurzen Zeitraum zu beschränken. Um den günstigsten Zeitpunkt für den Zusatz von GSH zu finden, war es zunächst erforderlich, die Insulinsekretion von isolierten Inseln in Gegenwart von 11,1 mM Glucose in Abhängigkeit von der Zeit zu messen. Wie Abb. (8) zeigt, verläuft die Insulinsekretion von isolierter Inseln nicht linear über die gesamte Zeit. So werden innerhalb der ersten 30 Minuten keine nennenswerte Mengen an Insulin sezerniert, die stärkste Sekretion findet zwischen der 40. und der 50. Minute statt. Anschließend flacht die Sekretionskurve wieder ab. Zur Untersuchung der Wirkung von GSH auf die Sekretion wurde GSH daher nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit 11,1 mM Glucose oder den üblichen Stimulatoren zugesetzt und nach 40 Minuten wurde die zwischen 30 und 40 Minuten durch Zusatz von GSH sezernierte Menge an Insulin bestimmt. Bei den Versuchen mit Diamid wurde dieses von Anfang zugesetzt und die sezernierte Menge an Insulin bei Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Diamid nach 40 Minuten Inkubation gemessen.

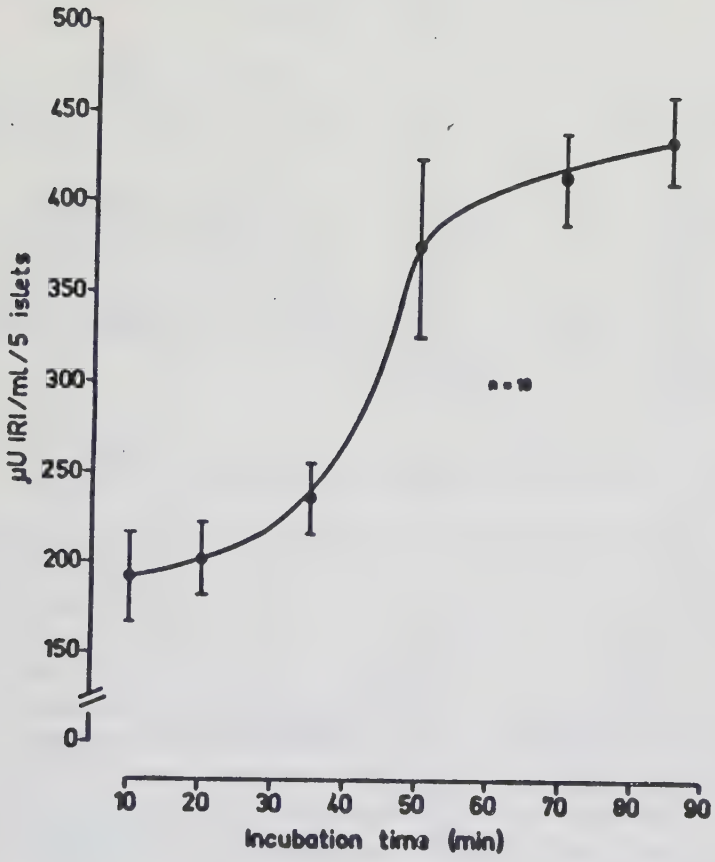


Abb. 8:

Zeitlicher Verlauf der Wirkung von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln.

Gruppen von je 5 Inseln wurden 10, 20 Min....usw. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4) mit 2 % BSA und 11,1 mM Glucose inkubiert.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Experimente;
IRI = immunoreactive insulin)

2.5.4.2 Einfluß verschiedener Konzentrationen von reduziertem Glutathion auf die durch 11,1 mM Glucose freigesetzte Menge an Insulin.

In Abwesenheit von GSH wird die Sekretion von Insulin durch 11,1 mM Glucose auf 243 ± 18 uU/ml innerhalb von 40 Minuten stimuliert. Wird von der 30. Minute ab noch Glutathion zugesetzt, so kommt es in einem Bereich von 0 - 0,1 mM zu einer weiteren Steigerung der Insulinsekretion mit einem Maximum bei 0,1 mM. Bei zusätzlicher Erhöhung der Glutathionkonzentration bis 1 mM nimmt dessen potenzierende Wirkung wieder ab und 2 mM GSH scheinen sogar einen gewissen Hemmeffekt auszuüben (siehe Abb. 9).

2.5.4.3 Einfluß von Diamid und t-BHP auf den RIA

In dieser Arbeit wurden als Hemmstoffe der Insulinsekretion Diamid und t-BHP verwendet. Während für GSH (0,1, 1 mM) und L-Cystein (5 mM) bereits gezeigt werden konnte (Abb. 7), daß 0,1 mM GSH den Radioimmunoassay nicht stört, mußten solche Untersuchungen mit Diamid und t-BHP erst durchgeführt werden, um sicherzugehen, daß eine mögliche zu beobachtende Hemmung der Sekretion nicht auf eine Störung des Radioimmunoassays durch obengenannte Substanzen zurückzuführen ist. Wie aus der Abb. 4 hervorgeht, beeinflußten weder Diamid noch t-BHP in den angegebenen Konzentrationen den Radioimmunoassay.

2.5.5 Berechnung der Versuchsergebnisse

Die Berechnung der Ergebnisse der Radioimmunoassays wurde nach der hyperbolischen Methode ausgeführt, wobei der Quotient B_o/B als eine lineare Funktion von x ausgedrückt wird (Rodbard et al. 1969). Aus den Doppelbestimmungen

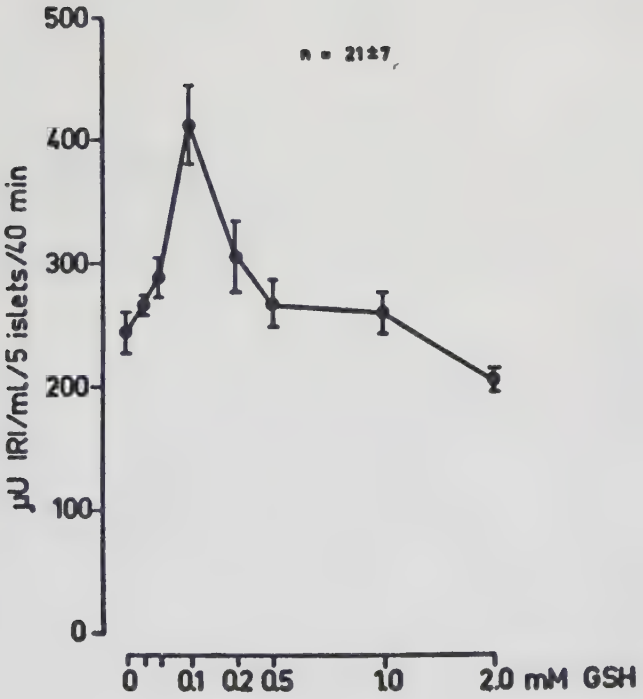


Abb. 9:

Einfluß verschiedener Konzentrationen von reduziertem Glutathion auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln.

Gruppen von je 5 Inseln wurden 40 Min. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4) mit 2 % BSA und 11,1 mM Glucose inkubiert. GSH wurde nach 30 Min. der Inkubation zugegeben.

(Means ± SEM; IRI = immunoreactive insulin)

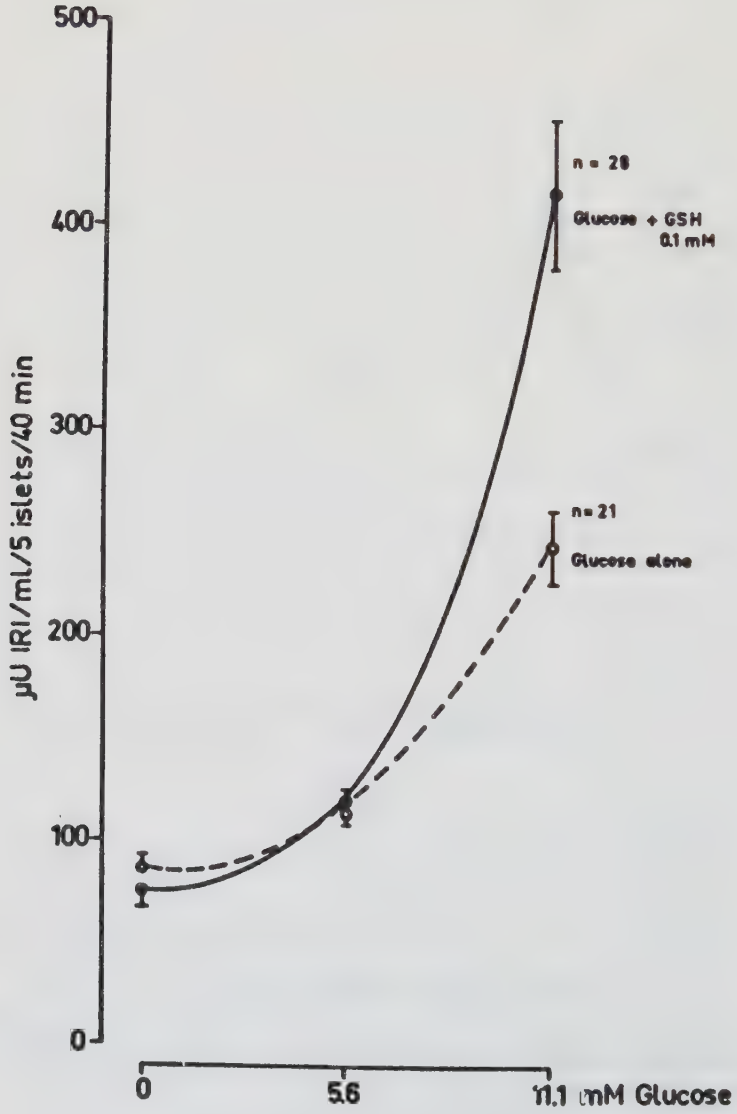

500
400
300
200
100
0
µU IRI/ml/5 islets/40 min
n = 28
Glucose + GSH
0.1 mM
n = 21
Glucose alone
0
5.6
11.1 mM Glucose

Abb. 10:

Abb. 10:

Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln bei Anwesenheit (———) oder Abwesenheit (-----) von 0,1 mM GSH.

Gruppen von je 5 Inseln wurden 40 Min. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4) mit 2 % BSA und 0, 5,6 und 11,1 mM Glucose inkubiert. GSH wurde nach 30 Min. der Inkubation zugegeben.

(Means $\pm$ SEM; IRI = immunoreactive insulin)

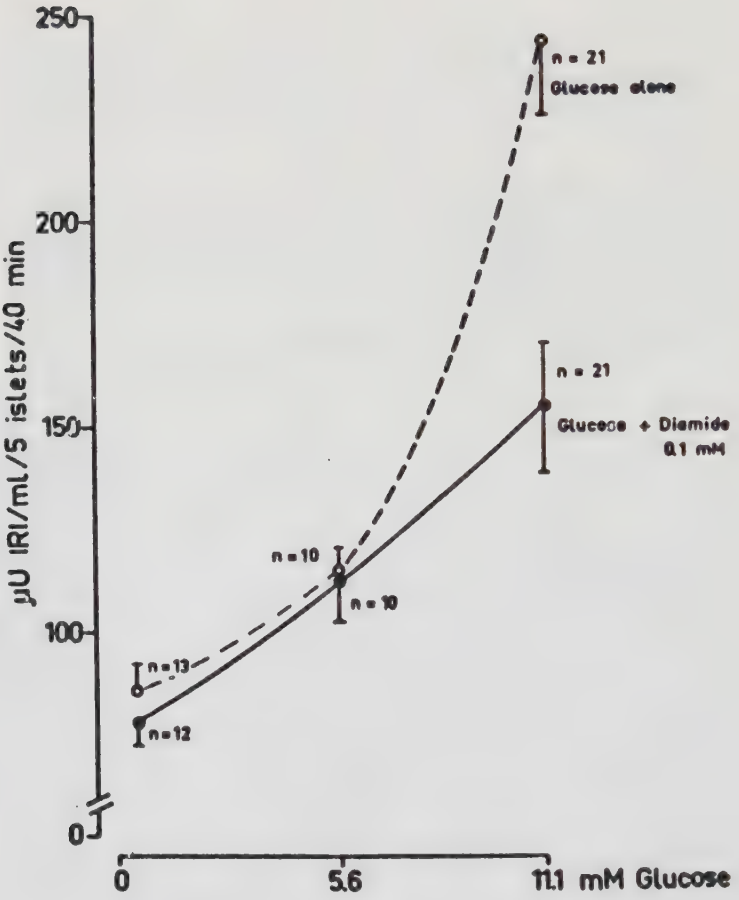


Abb. 11:

Einfluß verschiedener Konzentrationen von Glucose auf die Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln bei Anwesenheit (———) oder Abwesenheit (----) von 0,1 mM Diamid.

Gruppen von je 5 Inseln wurden 40 Min. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4) mit 2 % BSA und 0, 5,6 und 11,1 mM Glucose inkubiert.
(Means ± S.E.M.; IRI = immunoreactive insulin)

wurde der Mittelwert der Zählrate errechnet. Von diesen Mittelwerten wurde der Mittelwert des Blank-Wertes abgezogen. Aus der Zählrate des Nullwertes der Eichkurve (B_o) und den Zählraten der Proben bzw. Standards (B) wurde der Quotient B_o/B gebildet.

Mit Hilfe der Quotienten der Eichkurve konnten die cAMP- bzw. die Insulinwerte der Proben berechnet werden. Die Berechnung der Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion $Y = A + Bx$ erfolgte nach der Methodik der kleinsten Quadrate mit Hilfe eines Computerprogramms, mit dem auch gleichzeitig der Poarson-Bravoissche Korrelationskoeffizient r errechnet wurde.

Die so ermittelten cAMP-Werte ergaben die Menge cAMP/100 ul Probe und mußten nun unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens, in dem die Inseln extrahiert worden waren, und unter Berücksichtigung der Inselanzahl auf fmol cAMP/10 Inseln umgerechnet werden. Die Angaben der Insulingehalte erfolgen in uU IRI (immunoreaktives Insulin) pro Milliliter.

2.5.6 Auswertung der Versuchsergebnisse und Statistik

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen und Tabellen angegebenen Anzahl (n) von Versuchen.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student verwendet, wobei ein t-Test für $P < 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

In den Abb. 12 - 24 wurden auf der Ordinate die pro ml Effluat gemessenen Mengen an Insulin aufgetragen. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten an, nach der die Proben entnommen wurden. Zur statistischen Berechnung von Unterschieden in der Insulinsekretion während der 1. oder 2. Phase der Stimulation (1. Phase = 1 - 5 Minuten, 2. Phase

= 5 - 30 Minuten) wurden jeweils die Flächen unter den Insulinkurven abzüglich der Basalsekretion (= mittlere Insulinkonzentration zwischen - 5 und + 1 Minute) herangezogen. Die Mengen an sezerniertem Insulin im Effluat werden als Mikroeinheiten immunoreaktiven Insulins pro ml (uU IRI/ml) angegeben.

Die Flächenberechnung der Insulinwerte unter den Sekretionskurven während der 1. und 2. Phase wurde für einen Olivetti Tischcomputer programmiert und von diesem berechnet.

3. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

3.1 Isoliert-perfundiertes Rattenpankreas

3.1.1 Einfluß von t-Butylhydroperoxid (t.BHP) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion

Zur Überprüfung unseres Systems auf Funktionsfähigkeit wurde zunächst die Wirkung von 11,1 mM Glucose auf die Insulinkonzentration des Effluats untersucht. Wie aus der Abb. (12) zu sehen ist, zeigte sich die auch von anderen Autoren (Grodsky et al., 1968) beschriebene 2-phasige Sekretionsdynamik mit einem ersten Maximum 4,5 Minuten nach Beginn der Zufuhr von 11,1 mM Glucose. Die Sekretionsrate erreichte ein Maximum von 1181 uE/ml nach 4,5 Minuten und nahm danach wieder rasch ab, ohne jedoch auf die basale Insulinkonzentration zurückzugehen. Anschließend erfolgte ein zweiter langsamerer Anstieg der Sekretion mit einem Maximum nach 24 Minuten, dem dann erneut eine geringe Abnahme gegen Ende des hier gewählten Perfusionszeitraumes folgte. Wie aus der Abb. (13) ersichtlich ist, wird die insulinfreisetzende Wirkung von 11,1 mM Glucose durch den Zusatz von 2 mM t-BHP über den gesamten Zeitraum signifikant gehemmt.

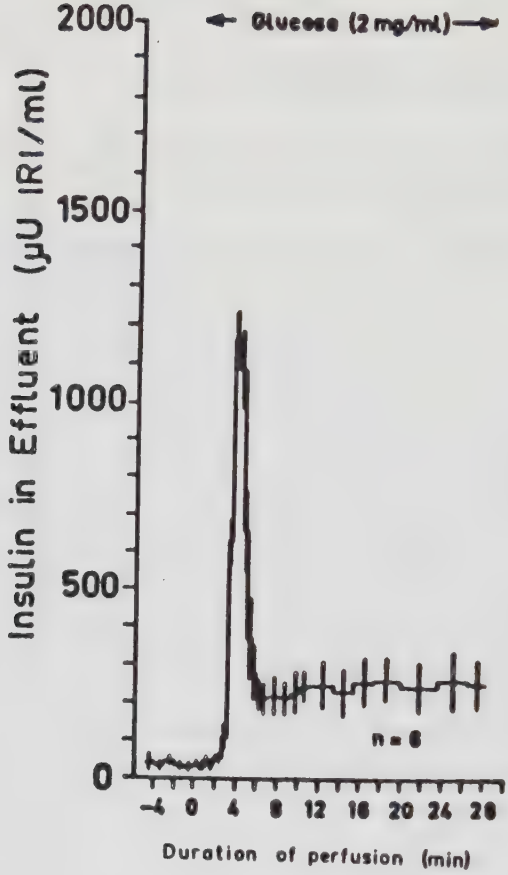


Abb. 12:

Einfluß von Glucose (11,1 mM) auf die Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

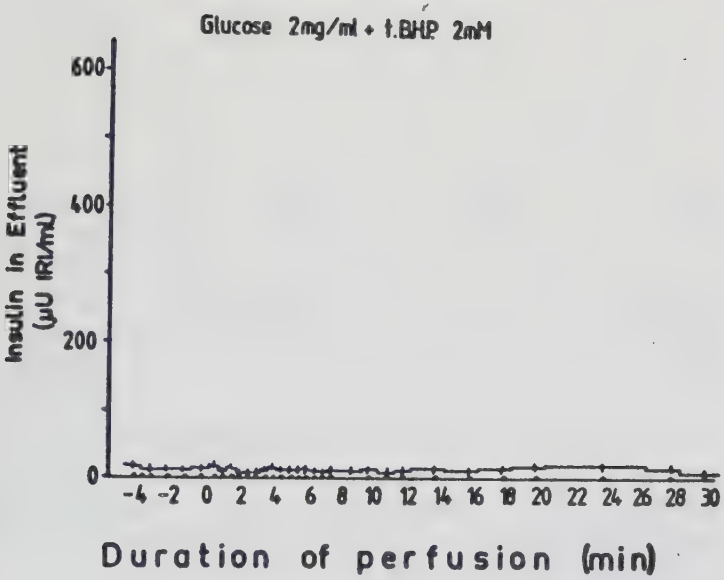


Abb. 13:

Einfluß von tert. Butylhydroperoxid (2 mM) auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

3.1.2 Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion

Vor Beginn der Stimulationsversuche mit reduziertem Glutathion (GSH) und L-Cystein wurde zunächst die Wirkung von 5,6 mM Glucose auf die Insulinkonzentration des Effluates untersucht. In Übereinstimmung mit den Angaben anderer Autoren (Landgraf et al., 1971) kommt es durch 5,6 mM Glucose nur zu einer sehr geringen Insulinsekretion (Abb. 15).

Wie der Abb. (14 u. 15) zu entnehmen ist, führte der Zusatz von GSH oder L-Cystein weder bei Abwesenheit noch bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose zur Steigerung der Insulinsekretion. Dagegen kam es in Gegenwart von 11,1 mM Glucose durch Zusatz von 1 mM GSH zu einer deutlichen Potenzierung der Sekretionsleistung (Abb. 16). Dies gilt sowohl für die 1. als auch für die 2. Phase der durch 11,1 mM Glucose induzierten Insulinsekretion. Dagegen führte 5 mM L-Cystein in Gegenwart von 11,1 mM Glucose nur zu einer signifikanten Steigerung der 1. Phase, während die 2. Phase der Glucose induzierten Sekretion von Insulin sogar signifikant gehemmt wurde (Abb. 16).

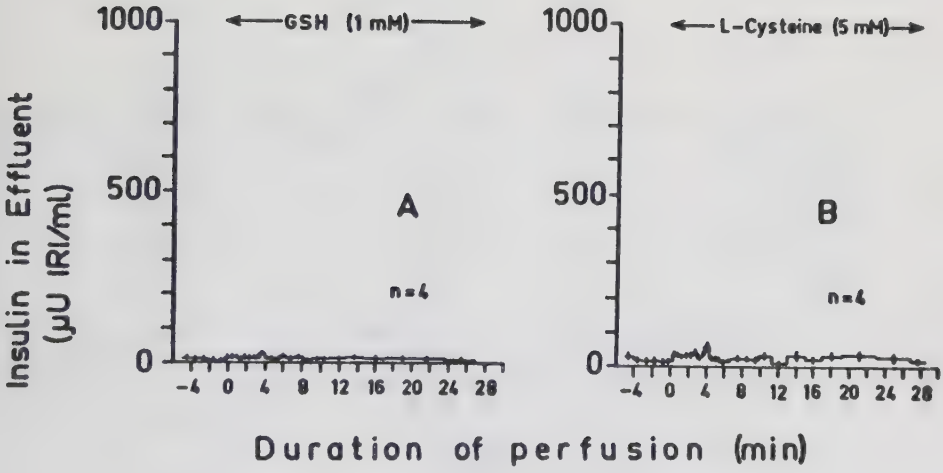


Abb. 14:

Einfluß von reduziertem Glutathion (1 mM) und L-Cystein (5 mM) auf die Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas bei Abwesenheit von Glucose.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

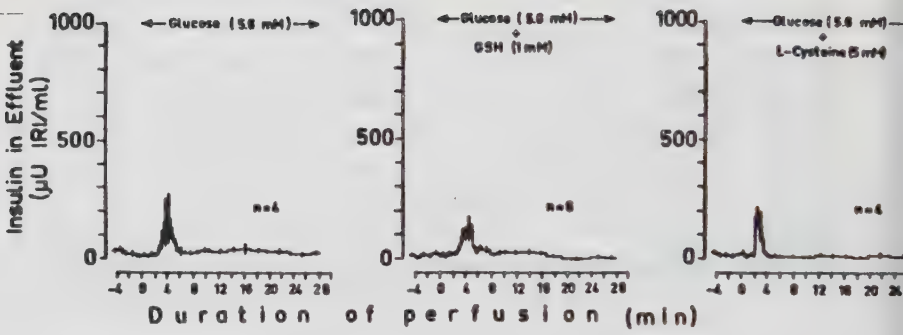


Abb. 15:

Einfluß von reduziertem Glutathion (1 mM) und L-Cystein (5 mM) auf die durch Glucose (5,6 mM) induzierte Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

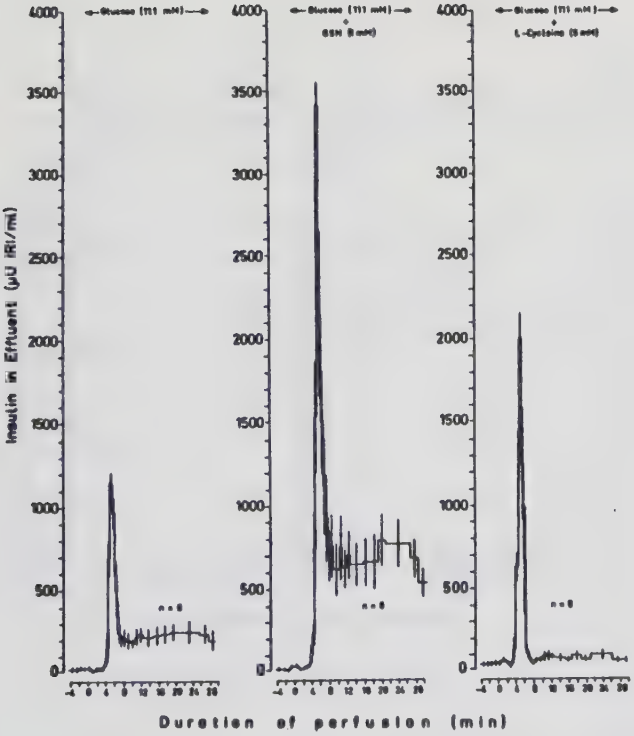


Abb. 16:

Einfluß von reduziertem Glutathion (1 mM) und L-Cystein (5 mM) auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

3.1.3. Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch 0,2 mg/ml Tolbutamid induzierte Insulinsekretion

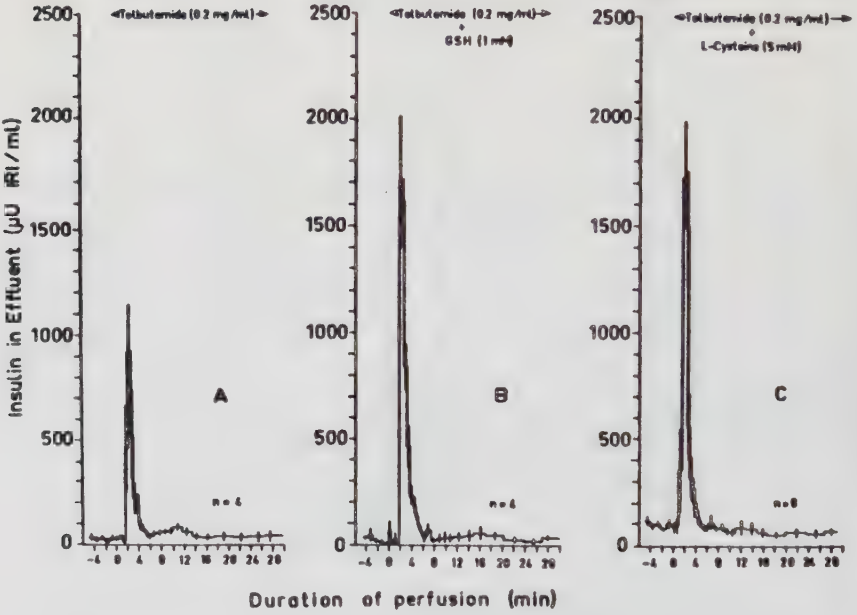


Abb. 17:

Einfluß von reduziertem Glutathion (1 mM) und L-Cystein (5 mM) auf die durch Tolbutamid (0,2 mg/ml) induzierte Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

Im Gegensatz zur Wirkung von Glucose kam es, wie aus Abb. (17) zu sehen ist, durch Tolbutamid (0,2 mg/ml) zu einer nur monophasigen Sekretionsdynamik mit einem Maximum von 925 uE/ml nach 3 Minuten. Abb. (14) zeigt, daß GSH und L-Cystein zu einer signifikanten Steigerung der durch Tolbutamid bewirkten Sekretion führten.

3.1.4. Einfluß von reduziertem Glutathion und L-Cystein auf die durch 0,1 mg/ml Tolbutamid + 5,6 mM Glucose hervorgerufene Insulinsekretion

Abb. (18) zeigt den Einfluß von 0,1 mg/ml Tolbutamid auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 5,6 mM Glucose. Wie dieser Abbildung zu entnehmen ist, führte Tolbutamid zu einer deutlichen Steigerung der monophasigen Sekretion von Insulin. Sie wird durch Zusatz von GSH und L-Cystein noch weiter verstärkt.

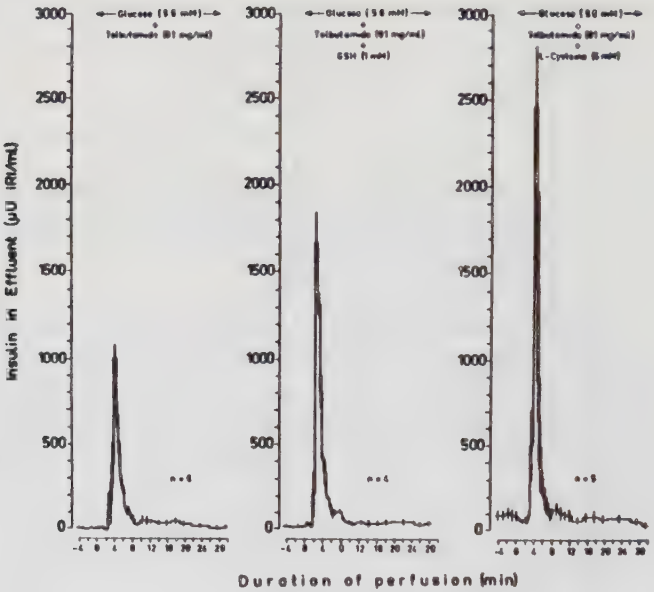


Abb. 18:

Einfluß von reduziertem Glutathion (1 mM) und L-Cystein (5 mM) auf die durch Tolbutamid (0,1 mg/ml) + Glucose (5,6 mM) induzierte Insulinfreisetzung aus dem isolierten perfundierten Rattenpankreas.

(Means ± S.E.M.; n = Zahl der Versuche)

3.2. cAMP - GEHALT LANGERHANS'SCHER INSELN

3.2.1 cAMP-Gehalt Langerhans'scher Inseln in Gegenwart von GSH

3.2.1.1 Abhängigkeit von Glucose- und GSH-Konzentration

Abb. (19) zeigt den Einfluß von 5,6 mM und 27,7 mM Glucose auf die cAMP-Konzentration in Langerhans'schen Inseln. In Abb. (20) und (21) ist der Effekt von 0; 0,1; 0,4; u. 0,8 mM GSH auf den cAMP-Gehalt isolierter Langerhans'scher Inseln in Gegenwart von 5,6 und 27,7 mM Glucose dargestellt.

GSH beeinflußt die basalen cAMP-Konzentration bei Inkubation der Inseln mit 5,6 mM Glucose nicht (Abb. 17). Sie lagen zwischen 46,8 und 60,3 fmol/10 Inseln. Bei einer Glucose-Konzentration von 27,7 mM ohne Zusatz von GSH wurde der cAMP-Gehalt von 60,3 auf 82,0 fmol/10 Inseln signifikant erhöht. Zusatz von GSH führte bei einer Konzentration von 0,4 mM zu einer weiteren Erhöhung des cAMP-Gehalts von 82,0 auf 110,9 fmol/10 Inseln (s.Abb. 20). Mit 0,1 und 0,8 mM GSH war eine solche Steigerung der Glucosewirkung nicht zu sehen. Die weiteren Untersuchungen zum cAMP-Gehalt Langerhans'scher Inseln in Gegenwart von GSH wurden daher bei einer Konzentration von 0,4 mM GSH durchgeführt.

Abb. 19

EINFLUß VON GLUCOSE AUF DEN cAMP-GEHALT ISOLIERTER LANGERHANS'SCHER INSELN VON RATTEN.
JE 10 INSELN WURDEN IN 2 ml MEDIUM 2,5 MINUTEN INKUBIERT.
MITTELWERT ± SEM (n).

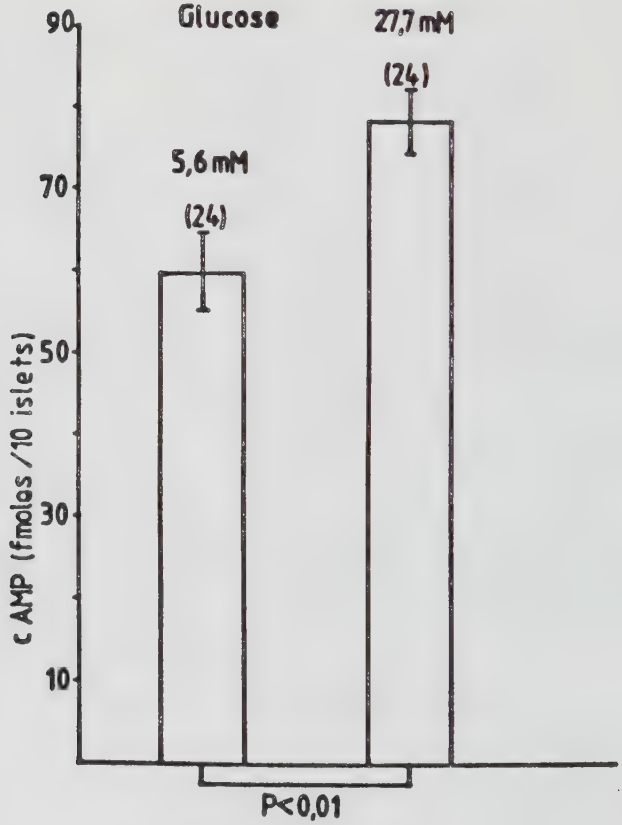


Abb. 20

EINFLUß VON GSH AUF DEN cAMP-GEHALT ISOLIERTER LANGERHANS'SCHER INSELN VON RATTEN IN GEGENWART VON 5,6 mM GLUCOSE.
JE 10 INSELN WURDEN IN 2 ml MEDIUM 2,5 MINUTEN INKUBIERT.
MITTELWERTE ± SEM (n)

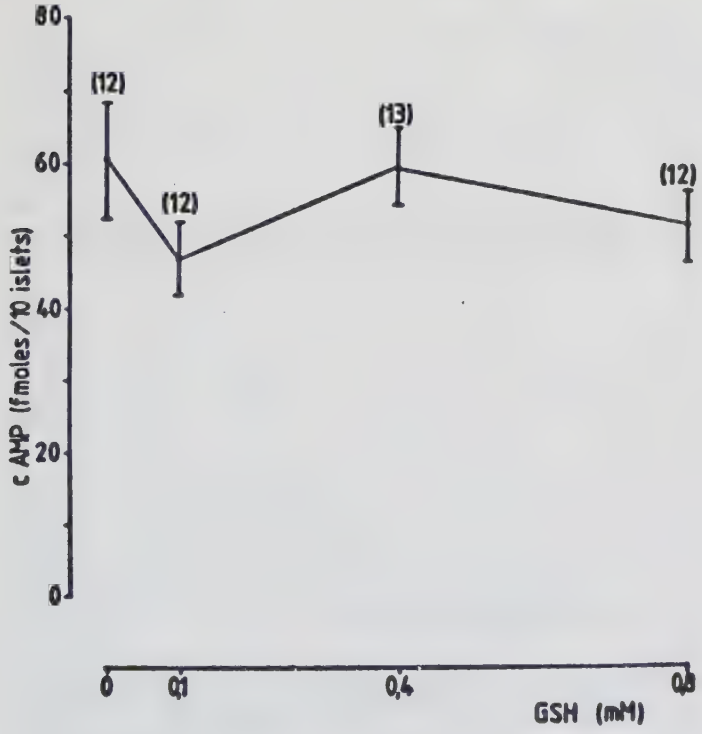
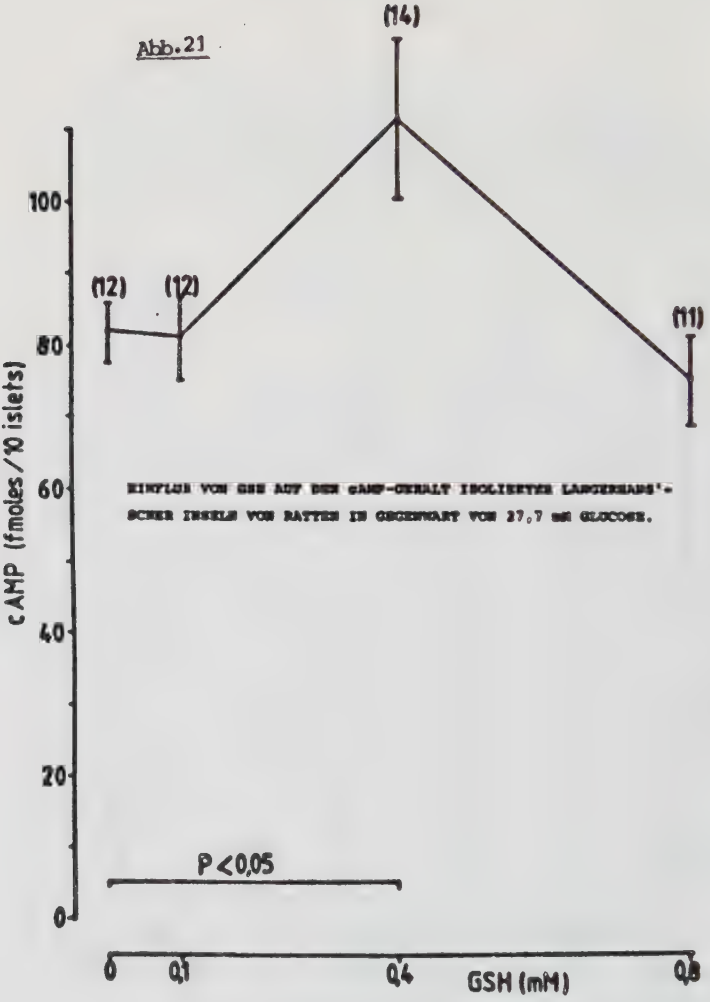


Abb.21



EINFLUß VON GSH AUF DEN cAMP-GEHALT ISOLIERTER LANGERHANS'-SCHER INSELN VON RATTEN IN GEGENWART VON 27,7 mM GLUCOSE.

3.3 THIOLABHÄNGIGKEIT DER INSULINSEKRETION AUS ISOLIERTEN LANGERHANS'SCHEN INSELN BEI VERWENDUNG VERSCHIEDENER STIMULATOREN

3.3.1 Einfluß von reduziertem Glutathion und von Diamid auf die durch Glucose, Fructose, Mannose und Glyzerinaldehyd induzierte Insulinsekretion

Wie der Abbildung (22) zu entnehmen ist, führte Glucose in Abwesenheit von GSH und Diamid zu einer dosisabhängigen Steigerung der Sekretion von Insulin. Äquimolare Mengen von Fructose und Mannose haben dagegen nur geringen stimulatorischen Effekt. Ebenfalls aus Abb. (22) ist ersichtlich, daß bei Verwendung von 11,1 mM Glyzerinaldehyd eine Sekretionsrate auftrat, die in der Nähe derjenigen liegt, die mit 11,1 mM Glucose beobachtet wurde.

Zusatz von reduziertem Glutathion führte weder bei Abwesenheit eines Stimulators noch bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Dagegen kam es in Gegenwart von 11,1 mM Glucose durch Zusatz von 0,1 mM GSH zu einer deutlichen Potenzierung der Sekretionsleitung. Ein ähnlicher Effekt wurde - wenn auch nicht in gleichem Umfang - in Gegenwart von Glyzerinaldehyd beobachtet. Weder die geringfügige insulinfreisetzende Wirkung der Fructose noch die der Mannose wurden durch reduziertes Glutathion gesteigert.

Zusatz des Thioloxidans Diamid führte in Gegenwart von 11,1 mM Glucose und 11,1 mM Glyzerinaldehyd zu einer signifikanten Abnahme der Stimulation der Insulinsekretion, während die sekretorische Wirkung von Fructose und Mannose nicht beeinflußt wurde.

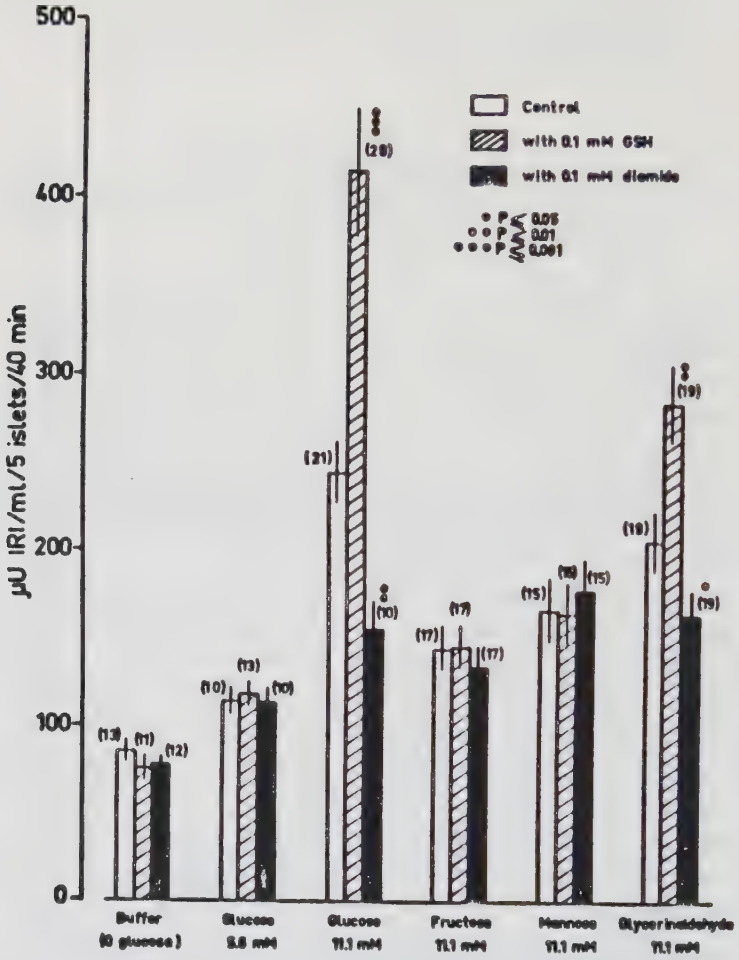


Abb. 22:

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch verschiedene Monosaccharide induzierte Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln.

3.3.2 Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Tolbutamid induzierte Sekretion von Insulin

Abbildung (23) zeigt, daß Tolbutamid (0,1 mg/ml) die durch 11,1 mM Glucose induzierte Sekretion von Insulin steigert. Durch GSH (0,1 mM) kann diese Steigerung nochmals verstärkt werden. Zusatz von Diamid (0,1 mM) führte zur signifikanten Hemmung der durch Tolbutamide (0,1 mg/ml) + Glucose (11,1 mM) stimulierten Insulinsekretion.

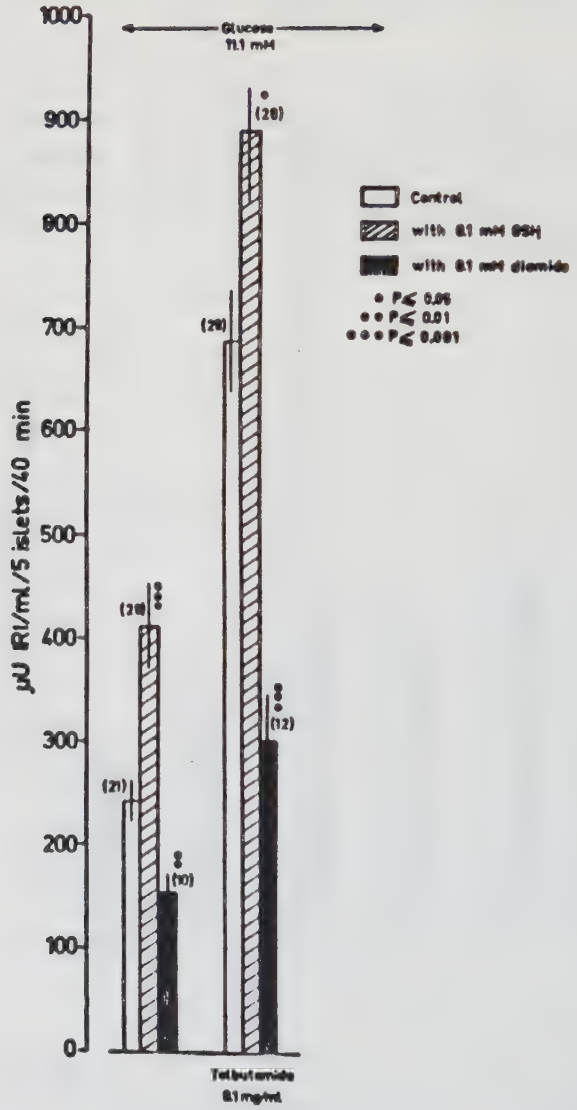


Abb. 23:

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch Tolbutamid induzierte Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln.

3.3.3 Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Leucin und Arginin induzierte Insulinsekretion

Wie aus der Abbildung (24) ersichtlich ist, führte GSH (0,1 mM) in Gegenwart von Leucin (10 mM) + Glucose (11,1 mM) zu einer signifikanten Zunahme der Stimulation der Insulinsekretion, während die sekretorische Wirkung von Arginin (10 mM) + Glucose (11,1 mM) nicht signifikant erhöht wurde. Diamid dagegen hemmte die synergistische Wirkung von Glucose einerseits und Leucin bzw. Arginin andererseits.

3.3.4. Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Glucagon, Isoprenalin und dibutyrylcyclo-AMP induzierte Sekretion von Insulin

Alle drei Stoffe führten - wie aus der Abb. (25) zu sehen ist - in Gegenwart von 5,6 mM zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion. Sie konnte jedoch in allen drei Fällen weder durch Zugabe von reduziertem Glutathion gesteigert noch durch Zugabe von Diamid gehemmt werden.

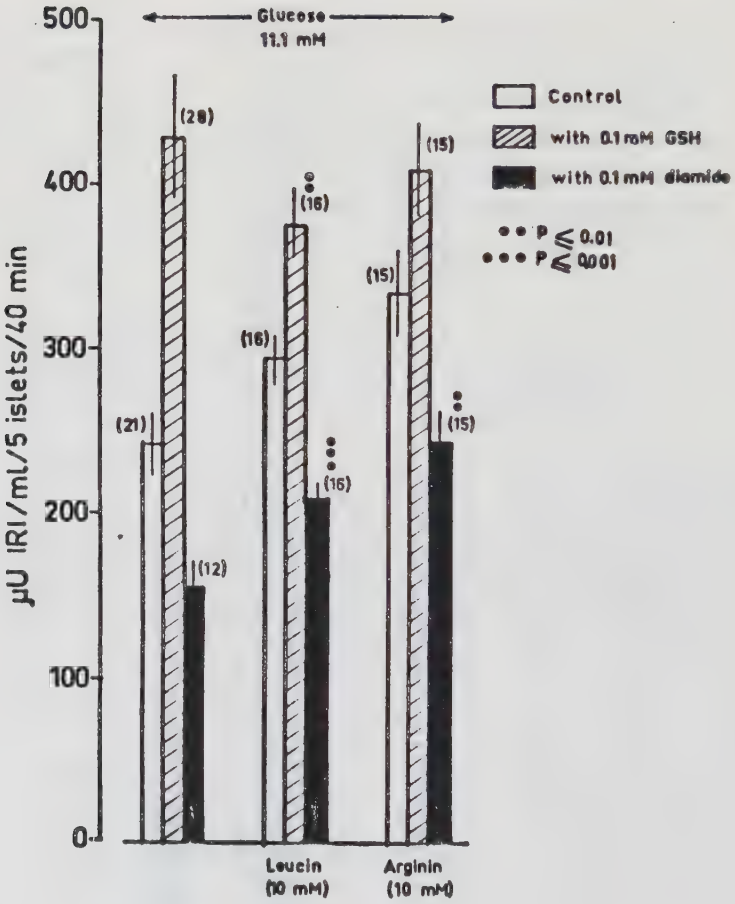


Abb. 24:

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch Leucin und Arginin induzierte Insulinfreisetzung aus isolierten Langerhansschen Inseln.

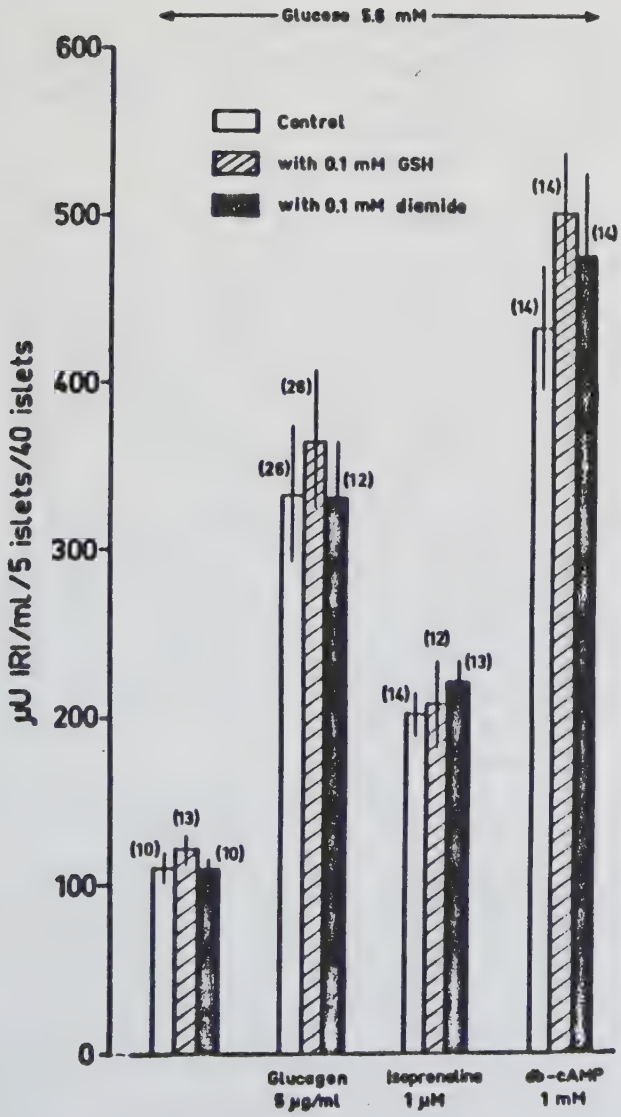


Abb. 25:

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP

4. DISKUSSION

4.1. Darstellung der Literatur zur Insulin freisetzenden Wirkung von Glucose, Fructose, Mannose, Glycerinaldehyd, Tolbutamid, Leucin, Arginin, Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP.

4.1.1. Monosaccharide

Glucose ist der bedeutendste physiologische Stimulator der Insulinsekretion. Die Dosiswirkungskurven für Insulin bei isolierten Inseln zeigt eine sigmoidale Form, mit einer schwachen Konzentration von 4 mM, einer halbmaximalen Wirkung von 8 mM, und mit einer maximalen Wirkung, die bei etwa 15 mM anzusiedeln ist (Malaisse et al., 1967; Ashcroft et el., 1972; Ashcroft, 1976).
Für Mannose werden Schwellenkonzentrationen, Km und die maximal stimulierende Wirkung mit 10,15 und 20 mM angegeben (Zawalich et al., 1977). Es besteht eine strenge Korrelation zwischen der Konzentration im extrazellulären Raum, ihren intrazellulären Metabolismus, ihre Wirkung auf die Calciumpermeabilität und ihre Wirkung auf die Insulinsekretion. Ishibashi et al., (1980) haben vermutet, daß insbesondere die niedrige Oxidationsrate von Mannose für seine geringe stimulierende Wirkung auf die Calciumaufnahme und die Sekretion von Insulin verantwortlich sein soll. Von Hellman et al., (1971a) wurde beobachtet, daß Mannose eine geringe kationische Aktivität auf die Calciumaufnahme in Inselgewebe hat. Fructose ist unwirksam, wenn es alleine anwesend ist, bis zu Konzentrationen hin von 50 mM, es führt jedoch zu einer Sekretion von Insulin in Gegenwart adäquater Mengen von Glucose oder anderen primären Stimulatoren (Ashcroft et al., 1972, 1973; Curry, 1974). Darüberhinaus führt Fructose nicht zu einer Änderung des NADPH/NADP-Quotienten von Inselzellen (Capito et al., 1982).

Die Stimulation der Freisetzung von Insulin durch Glycerinaldehyd, welches in den glykolytischen Stoffwechselweg auf den Stufen der Triosen eingehen dürfte, wurde im Detail in vivo (Ashcroft und Crossley, 1975) bzw. in vitro (Ashcroft et al., 1973; Hellman et al., 1974; Tain et al., 1975; Malaisse et al., 1976; Zawalich et al., 1979) untersucht. Die sekretorische Wirkung von Glycerinaldehyd ist, was seine Zeitabhängigkeit betrifft, biphasisch und daher ähnlich wie die von Glucose, aber auch ähnlich, was andere Parameter der Inselfunktion betrifft, wie z.B. seine Wirkung auf die Proinsulinbiosynthese, die Calciumaufnahme, den Calciumefflux sowie die Freisetzung von Insulin und seine eigene Stoffwechselrate (Malaisse et al., 1976). D-Glycerinaldehyd wird durch Inseln gut verstoffwechselt, wie aus der Bildung von $^{14}CO_2$ aus [U-^{14}C] Glycerinaldehyd hergeht (Ashcroft et al., 1973; Hellman et al., 1974) oder wie auch aus der ^3H_2O-Bildung aus [2-^{3}H] -Glycerinaldehyd hervorgeht (Zawalich et al., 1979). Es soll hier festgehalten werden, daß der Abbau von Glycerinaldehyd nicht durch Mannoheptulose beeinflußt wird, letztere hemmt auch nicht die insulinfreisetzende Wirkung von Glycerinaldehyd (Ashcroft et al., 1973; Hellman et al., 1974).

4.1.2. Sulfonylharnstoffe

Es ist bekannt, daß bei Verwendung des perfundierten Pankreas Sulfonylharnstoffe eine prompte Freisetzung von Insulin hervorrufen (Mariani, 1969; Grodsky et al., 1969; 1971). Die sekretorische Antwort auf diese Stoffe tritt früher auf, als wenn man z.B. bei einem perfundierten Pankreas Glucose als Stimulator verwendet (Curry, 1971; Gabbay und Tze, 1972). Neben der prompten Freisetzung von Insulin ist auch die dynamische Antwort der Sekretion bei den Sulfonylharnstoffen unterschiedlich gegenüber Glucose. So führt Tolbutamid z.B., bei Abwesenheit von Glucose zu

einem charakteristischen sofort auftretenden Peak der Insulinsekretion, dem dann nur noch eine geringfügige Steigerung der Freisetzung knapp oberhalb der Basalwerte in der späteren Phase folgt (Grodsky et al., 1969; Loubatiéres, 1969). Keiner der Sulfonylharnstoffe ruft die typische zweite Phase der Insulinsekretion hervor, wie man sie z.B. bei Anwendung von Glucose findet (Grodsky et al., 1971), und es wurde auch daran gedacht, daß der Mechanismus, über den Sulfonylharnstoffe die Sekretion von Insulin stimuliert, von den der Glucose unterschiedlich ist (Fussgänger et al,, 1969; Lacy et al., 1972; Ryan et al., 1967; Donnely und Turtle, 1974; Pace et al., 1975; Hellman et al., 1971b; Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968; Basabe et al., 1971; Tomita et al., 1974; Lenzen, 1975). Es scheint allerdings mehr wahrscheinlich, daß, obwohl chemisch nicht sehr einleuchtend, Sulfonylharnstoffe mit SH-Gruppen auf der Membran der ß-Zelle reagieren und auf diese Weise die Sekretion auslösen können (Hellman et al., 1974). Dies ist besonders für das Tolbutamid von Interesse, da dieses die ß-Zellmembran nicht permeieren kann (Hellman et al., 1971b). Es ist daher denkbar, daß die Wirkung von Tolbutamid auf die Insulinsekretion in irgendeiner Weise vom Redoxzustand membranständiger SH-Gruppen abhängig ist.

Kürzlich berichteten Charles et al., (1976) und Grill und Cerasi (1978), daß Tolbutamid zur Zunahme des cAMP-Spiegels bei perfundierten und inkubierten Inseln gleichzeitig zu einer Steigerung der Insulinsekretion führt. In den vergangenen Jahren hat sich zunehmend die Ansicht verdichtet, daß das Adenylzyklase-cAMP-System in die insulinfreisetzende Wirkung dieser Stoffe involviert ist (Loubatiéres 1972; Levey et al., 1972). Montague und Howell (1973) bemerkten, daß Glibenclamid und Tolbutamid die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase in Inseln von Ratten steigert. In Inselhomogenaten hemmt Tolbutamid die Phosphodiesteraseaktivität (Sams und Montague, 1972;

Ashcroft et al., 1972; Bowen und Lazarus, 1973).

Aufbauend auf den Ergebnissen von Hellman et al. (1971b; 1973), nach denen Tolbutamid die ß-Zellmembranen nicht permeiert, könnte man annehmen, daß der primäre Ort der Wirkung dieser Substanz im Bereich der Zellmembran lokalisiert ist, wie dies 1975 auch von Orci et al. angenommen wurde. Untersuchungen über Tolbutamid, die kürzlich zur Calciumaufnahme durchgeführt wurden, legen nahe, daß der primäre Effekt des Tolbutamid in einer Interaktion mit dem Calciumtransport durch Zellmembranen besteht (Kawazu et al., 1980). Diese Ansicht wurde weiter verstärkt durch Untersuchungen, die zeigen, daß die hypoglykämische Wirkung von Sulfonylharnstoffen möglich sind, um Calcium zu translokalisieren, in oder durch eine hydrophobe Region, und daß sie Calciumaufnahme in Inseln mit Hilfe einer ionophoretischen Wirkung hervorrufen (Coutuier und Malaisse, 1981). In der Tat ist jedoch die von Meissner und Atwater, 1976 und Meissner et al., 1980 beobachtete Stimulation der elektrischen Aktivität und die von Henquin (1980) beschriebene Hemmung des Rubidiumefffluxes durch eine Ionophorwirkung des Tolbutamids schwer zu erklären.

4.1.3. Arginin und Leucin

Von den beiden Aminosäuren Arginin und Leucin ist seit langem bekannt, daß sie die Insulinsekretion stimulieren (Fajans et al., 1967). Es liegen aber unterschiedliche Ergebnisse vor, ob dazu Glucose benötigt wird (Basabe et al., 1971; Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968) oder nicht (Levin et al., 1972; Lernmark, 1972). Arginin selbst wird in der ß-Zelle nicht verstoffwechselt und führt zu keiner Steigerung der Glucoseoxidation (Hellman et al., 1971c). Auch der Gehalt an reduzierten Pyridinnucleotiden, gemessen an der Gesamtfluoreszenz, wurde durch Arginin nicht verändert (Panten und Christians, 1973). Wurde NADPH und

NADH separat bestimmt, so zeigt sich, daß der Gehalt an NADPH in den Inseln geringfügig, aber nicht signifikant erhöht wird. NADP, NAD und NADH blieben unbeeinflußt (Hoppe, 1978).

Da die Wirkung des Arginin von der Glucosekonzentration abhängig ist, erscheint es aber auch möglich, daß der Glucosemetabolismus Metaboliten oder Cofaktoren für die Sekretionsfähigkeit des Arginin bereitstellt. So hemmt Mannoheptulose die Insulin freisetzende Wirkung des Arginin (Fajans et al., 1971).

Unklar ist allerdings, ob Leucin die Anwesenheit von Glucose benötigt, um seine Insulin-freisetzende Wirkung zu entfalten. Einerseits wurde eine Insulinsekretion nach Leucin in Abwesenheit von Glucose beobachtet (Basabe et al., 1971; und Levin et al., 1972), andererseits von verschiedener Seite festgestellt, daß Leucin die insulinotrope Wirkung von Glucose steigert (Milner, 1969; Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968). Befunde von Malaisse et al. (1980) zeigen, daß der NADPH/NADP-Quotient durch Leucin bei Abwesenheit von Glucose nicht verändert wird. Andererseits war aber der NADPH-Gehalt, dessen wichtigste Quelle der PPS darstellt, nach 10 mM Leucin in Gegenwart von 11,1 mM Glucose signifikant erhöht (Ammon et al., 1979a). Möglicherweise führt Leucin auf andere Weise zur Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten als durch Steigerung der PPS-Aktivität. Denkbar wäre eine Übertragung des Wasserstoffs von NADH auf NADP mit Hilfe von Transhydrogenasen. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, daß eine Zunahme von NADH nach Inkubation mit Leucin (Malaisse et al., 1980) und Leucin plus Glucose (Ammon et al., 1979a) beobachtet wurde. Dieser durch Leucin hervorgerufene NADH-Anstieg erfolgt durch den Abbau von Leucin, allerdings nicht über die Glycolyse, denn diesen Stoffwechselweg beeinflußt Leucin im Gegensatz zu Glucose nicht (Gylfe und Sehlin, 1976). Möglicherweise wird durch Leucin der NADH-Gehalt durch Stimulation der mitochondria-

len Glutamat-Dehydrogenase in Inseln erhöht (Gylfe, 1976).

Panten et al. (1972), die einen raschen Anstieg reduzierter Pyridinnukleotide nach L-Leucin feststellten, glauben, daß dieser Anstieg v.a. durch Produktion von NADH in den Mitochondrien unter Einwirkung der α-KIC-Dehydrogenase zustandekommt, denn nach Acetoacetat und ß-Hydroxybutyrat war keine Fluoreszenzänderung zu beobachten. In Frage gestellt sind diese Ergebnisse dadurch, daß auch das nicht metabolisierbare b-BCH zu einem Fluoreszenzanstieg führt (Panten und Christians, 1973) und möglicherweise die Fluoreszenzänderung durch Reaktion von Leucin mit seinem Rezeptor hervorgerufen wird. Daß aber auch NADPH, selbst wenn es über NADH bereitgestellt wird, für die Insulinsekretion von Bedeutung ist, ergibt sich aus der Tatsache, daß Methylenblau den durch Glucose plus Leucin stimulierten NADPH/NADP-Quotienten (Ammon et al., 1979a) und die Insulinsekretion (Ammon et al., 1979) hemmt, nicht aber den NADH/NAD-Quotienten (Hoppe, 1978).

In unserem Labor wurde festgestellt, daß der GSH/GSSG-Quotient durch Leucin allein nicht verändert wird (Ammon et al., 1980). Setzt man dem Inkubationsmedium aber Leucin plus 5,6 mM Glucose zu, so nehmen im Vergleich zu Glucose allein sowohl der NADPH (Hoppe, 1978) als auch der GSH-Gehalt der Insel zu, der NADP- und GSSG-Gehalt entsprechend ab (Lutz, 1981).

4.1.4. Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP:

cAMP wird intrazellulär mit Hilfe des Enzyms Adenylatcyclase in einer Mg^{2+}-abhängigen Reaktion aus ATP gebildet (Sutherland et al., 1962). Adenylatcyclase wurde in fast allen untersuchten tierischen Geweben gefunden, meist liegt sie in einer plasmamembrangebundenen Form vor (Perkins, 1973). Nach heutiger Vorstellung besteht das Adenylatcyclase-System aus einem die Reaktion ATP $\rightarrow$ cAMP +

Diphosphat katalysierenden Enzymteil an der Innenseite der Membran und einem hormonbildenden Rezeptorteil. Unklar ist noch, wie Rezeptor- und Enzymteil räumlich zueinander angeordnet sind und wie sie für die physiologischen Prozesse miteinander in Verbindung stehen (Perkins, 1973; und Schultz, 1972).

Der Abbau von cAMP erfolgt mit Hilfe der cAMP-Phosphodiesterase, es entsteht in einer ebenfalls Mg^{2+}-abhängigen Reaktion Adenosin-5'-monophosphat. Im Gegensatz zur membrangebundenen Adenylcyclase liegt die Phosphodiesterase neben einer membrangebundenen zu einem großen Teil in löslicher Form vor (Butcher und Sutherland, 1962). Bildung und Abbau von cAMP sind an sich unspezifische Prozesse, die sich in allen Zellen gleich abspielen. Dieses der Wirkung zahlreicher Hormone zugrunde liegende Prinzip wird als "second messenger"-Konzept bezeichnet, wobei das Hormon selbst der 1. Bote und cAMP der 2. Bote ist (Robison et al., 1971). Die verschiedenen Zellen enthalten Rezeptoren für verschiedene Hormone. Kommt es zur Wechselwirkung Hormon-Rezeptor, wird die Adenylatcyclase aktiviert, die cAMP-Konzentration in der Zelle steigt an und löst die jeweilige für die Zelle typische Reaktion aus (Sutherland, 1972). cAMP veranlaßt dabei - je nach Zelle - so unterschiedliche Vorgänge wie Aktivitätsänderungen von Enzymen, Beeinflussung der Proteinbiosynthese, Permeabilitätsänderungen von Membranen, Transportvorgänge, Änderungen der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration, Wirkungen auf Kontraktile Elemente und Abgabe von Hormonen (Übersichten bei Losert, 1973; Schultz, 1971; Sutherland, 1972).

Bei den Untersuchungen zum Mechanismus der Insulinsekretion aus den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln zeigte sich, daß auch hier das cAMP-Adenylatcyclase-System eine Rolle spielt (Ashcroft, 1976; Cerasi, 1975; Cerasi und Grill, 1977; Gerich et al., 1976; Lambert, 1976; Malaisse, 1975; Montague und Howell, 1975; und Sutherland und Robison, 1969). Nun liegen zur Wirkung des wichtigsten physiologischen Stimulators der Insulinsekretion, zur Wirkung der Glucose, auf den cAMP-Gehalt Langerhansscher Inseln zwar

kontroverse Angaben in der Literatur vor, die später noch ausführlicher diskutiert werden, doch kann man heute als sicher annehmen, daß Glucose zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der ß-Zelle führt (Cerasi und Grill, 1977; Malaisse et al., 1979; und Ashcroft, 1980). Eine Potenzierung der Glucose induzierten Insulinsekretion mit Aktivatoren der Adenylatcyclase wie z.B. Glucagon, ACTH, TSH (Malaisse et al., 1967a), Sekretin, Pankreozymin, Isoprenalin und Prostaglandine (Montague und Howell, 1975; und Sharp et al., 1975) konnte mehrfach gezeigt werden. Zugabe von exogenem cAMP zu intakten Zellen sollte die Hormonwirkung imitieren. Durch exogen zugesetztes cAMP wird die Glucose induzierte Insulinsekretion beim isoliert perfundierten Rattenpankreas (Sussman und Vaughan, 1967), bei isolierten Inseln von Goldhamstern (Sodoyez et al., 1969) und bei Pankreasteilen von Ratten in vitro (Malaisse et al., 1967a & b) verstärkt. Eine noch deutlichere Potenzierung erreicht man bei Verwendung von cAMP-Derivaten wie Dibutyl cAMP (Ammon, 1975; Ashcroft, 1976, und Sodoyez et al., 1969), das lipophiler und membrandurchgängiger ist und durch die cAMP-Phosphodiesterase wesentlich langsamer als cAMP selbst hydrolysiert wird (Cehovic et al., 1972).

4.2. Einfluß von Thiolen auf die durch Glucose und Tolbutamid induzierte Sekretion von Insulin beim perfundierten Pankreas.

Wie die Abb. (14 & 15) zeigen, wenn das Pankreas mit 1 mM GSH oder 5 mM Cystein entweder in der Abwesenheit von Glucose oder in der Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosemenge perfundiert wurde, konnte niemals eine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion festgestellt werden, woraus hervorgeht, daß die Zufuhr von Thiolen allein den sekretorischen Prozeß nicht iniziiert. Aus den

Daten (Abb. 16-18), die zeigen, daß die insulinfreisetzende von Tolbutamid und Glucose durch Glutathion potenziert werden kann, ergibt sich ein weiterer Beweis für unsere Hypothese, daß für eine erhöhte Verfügbarkeit von Thiolen für die Membran, die ß-Zelle gegenüber der insulinfreisetzenden Wirkung von Glucose und Tolbutamid sensibilisiert.

Bisher ist die Funktion der Thiole und ihre mögliche Beteiligung am physiologischen Mechanismus der Insulinfreisetzung noch immer unklar. Seit einigen Jahren ist es bekannt, daß reduziertes Glutathion als ein intrazellulärer Redoxpuffer funktioniert (Axelsson und Mannervik, 1975), und zwar bei verschiedenen biochemischen Prozessen und das Gemisch der Membran-GSH-Disulfide rasch durch reduziertes Glutathion reduziert werden können (Haest et al., 1979). Kürzlich wurde gezeigt, daß die Perfusion von Hornhaut am Kaninchen mit einer Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung, die GSH enthielt, die intrazelluläre Konzentration von Hornhautepithelien an GSH steigert (Whikehart und Edelhauser, 1978). Man könnte annehmen, daß die Zufuhr von exogenem GSH ein Membranprotein - SSG zu Prot. - SH umwandelt, wo es nun seinerseits als Pool fürs intrazelluläre GSSG, und somit zu intrazellulärem Anstieg an GSH führen kann.

Wegen des hohen Sauerstoffpartialdruckes im Perfusionsmedium ist es schwierig, auszuschließen, daß Thiole auch zu Disulfidbrücken der ß-Zellmembran führen können. Auf der anderen Seite sprechen die negativen Ergebnisse, die durch Zufuhr von oxidiertem Glutathion (Hellman et al., 1975) erhalten wurden, welches eher zu einer Hemmung der Insulinsekretion führten, dagegen, daß die potenzierende Wirkung des reduzietem Glutathions auf seine Oxidation zurückzuführen ist.

Was immer auch der molekulare Mechanismus der insulinfreisetzenden Wirkung von Tolbutamid ist, es wurde gefunden, daß es zur Zunahme von cAMP in perfundierten Inseln führt

(Charles et al., 1976). Montague und Howell (1973) beobachteten, daß Glibenclamid und Tolbutamid die Aktivität einer cAMP-abhängigen Proteinkinase in isolierten Inseln steigerte. Darüberhinaus wurde beobachtet, daß Tolbutamid die Adenylcyclase von Inseln stimuliert (Kuo et al., 1973; Levey et al., 1972). In anderen Geweben, wie z.B. in Rattenadepozyten wurde beobachtet, daß deren Adenylcyclase von SH-Gruppen abhängig ist (Mukherjee und Lynn, 1979). Ob eine Wirkung von exogen zugeführten Thiolen auf das cAMP-System letztlich dafür verantwortlich ist, daß die durch Glucose und Tolbutamid hervorgerufene Sekretion von Insulin weiter gesteigert wird, kann aufgrund der bisherigen Befunde nicht geklärt werden, wird aber nach den anschließend zu diskutierenden Befunden über die Thiolabhängigkeit verschiedener Stimulatoren der Insulinsekretion erläutert werden. Jedenfalls zeigen die bisher diskutierten Daten, daß eine Zufuhr von Thiolen zum perfundierten Pankreas sowohl die erste als auch die zweite Phase der Insulinsekretion durch Glucose zu potenzieren vermögen, während Thiole für sich allein noch nicht zu einer Sekretion von Insulin führen.

4.3. Thiolabhängige und nicht thiolabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion

Die in unserer Untersuchung verwendeten Initiatoren der Insulinsekretion wie z.B. Glucose, Fructose, Mannose, Glycerinaldehyd, Tolbutamid, Arginin, Leucin, Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP decken wohl zum größten Teil hinsichtlich der bekannten bzw. hypothetischen Mechanismen das gesamte Feld der Insulinsekretagoga. Allgemein ist zunächst zu sagen, daß die Reihenfolge der zytophysiologischen Vorgänge, die letztlich zur Sekretion von Insulin durch die pankreatische ß-Zelle in Gegenwart eines Stimulators führen, 3 größere Schritte beinhaltet. Der erste Schritt besteht in der Erkennung des insulinotropen Signals durch

die ß-Zelle. Die Art eines solchen Erkennungsprozesses unterscheidet sich zwischen den verschiedenen insulinotropen Stoffen. Es wird gegenwärtig angenommen, daß Hormone und Neurotransmitter wie Katecholamine und cholinerge Substanzen sowie Polypeptidhormone ihre Wirkung über irgendeine Art von Plasmamembranreceptor auf die ß-Zelle vermitteln und daß ihre stimulierende bzw. auch hemmende Wirkung auf die Insulinsekretion nach ihrer Bindung an entsprechende Rezeptoren stattfindet (Goldfine et al., 1972; Verspohl und Ammon, 1980).

Sogenannte Nahrungssekretagoga, wie z.B. Glucose und Leucin geben Hinweise dafür, daß der Stoffwechsel dieser Verbindungen essentiell für ihre Erkennung als Signal für die Inselzelle ist (Ashcroft, 1980; Malaisse et al., 1979). Dagegen wird bei anderen Sekretagoga, wie z.B. Sulfonylharnstoffen eine Wechselwirkung in den biophysikalischen Eigenschaften der ß-Zellmembran diskutiert, die als solche den initialen Schritt für die Sekretionslösung darstellt (Couturier und Malaisse, 1981).

Der zweite Schritt in der Sequenz der Ereignisse, die schließlich zur Sekretion führen, besteht in der Kopplung des Signalprozesses an die Aktivierung des Effektorsystems, das letztlich für die Exozytosis der sekretorischen Granula verantwortlich ist. Hier wird gegenwärtig die Betonung auf die Rolle des intrazellulären Calciums als einen anscheinenden weiteren Trigger für die Insulinsekretion gelegt (Malaisse et al., 1978b). Für den Fall, daß die Annahme richtig ist, daß die Zunahme des cytosoischen Calciums in der Tat die Freisetzung von Insulinsekretion stimuliert, dann sollten alle Kopplungsfaktoren in einer Weise den Transport von Calcium durch die Cytoplasmamembran oder von der Cytoplasmamembran oder anderen Organellen in das Cytosol bewirken.

Der letzte Schritt im Sekretionsprozess kann als die Bewegung der sekretorischen Granula hin zur Cytoplasmamembran gesehen werden, wo sie durch Fusion mit der Zellmem-

bran schließlich das Insulin an den extrazellulären Raum abgeben. Ein mikrotubuläres-mikrofilamentäres System scheint hier die Schlüsselrolle für diesen Prozess zu spielen (Howell und Tyhurst, 1982).

Nimmt man die Ergebnisse der Abbildung 22-25 zusammen, so zeigen unsere Ergebnisse, daß bei einem Teil der Stimulatoren der Insulinsekretion der Redoxstatus des GSH-Systems eine regulierende Rolle im Sekretionsmechanismus spielt. Unsere Ergebnisse zeigen auch, daß die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose, Glycerinaldehyd und die kombinierte Wirkung von Glucose mit Leucin und Glucose mit Tolbutamid durch den Zusatz von GSH weiter gesteigert, durch das Thioloxidans Diamid jedoch gehemmt wird. Auf der anderen Seite war die insulinfreisetzende Wirkung von Fructose, Mannose, des Calciumionophors A 23187 (Ammon et al., 1983) und die kombinierte Wirkung von Glibenclamid mit 11,1 mM Glucose (Ammon et al., 1983) sowie die kombinierte Wirkung von Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP mit 5,6 mM Glucose weder durch GSH gesteigert noch durch Diamid gehemmt. Daraus läßt sich vermuten, daß die insulinfreisetzende Wirkung letzterer Stoffe nicht von Thiolen abhängig ist. Wir können also aufgrund unserer Befunde hinsichtlich der Thiolabhängigkeit 2 verschiedene Gruppen von Insulinsekretagogen voneinander unterscheiden.

Obwohl der Mechanismus der Insulinsekretion bei all den von uns verwendeten Stoffen zwar in Umrissen bekannt, aber inkomplett ist, scheint es doch so zu sein, daß alle von ihnen, wie bereits erwähnt, letztlich zu einer Zunahme des cytosotischen Calciums führen. Die Zunahme der Calciumkonzentration in dem cytoplasmatischen Rahmen kann theoretisch auf verschiedene Weise erreicht werden:

1.) Eine Steigerung der Calciumaufnahme durch den potentialabhängigen Calciumkanal, wie sie durch Glucose, Glycerinaldehyd, Leucin und Tolbutamid induziert wird (Malaisse et al., 1976; 1979a; 1980 und Henquin, 1980).

2.) Eine Hemmung des Calciumeffluxes, wie sie bisher im Falle der Glucose beobachtet wurde (Malaisse et al., 1973).

3.) Ein ionophoretischer Calciumtransport, wie er durch das calciumkomplexbildende Antibiotikum A 23187 hervorgerufen wird (Malaisse et al., 1979c).

4.) Durch einen intrazellulären Speicher in das Cytosol hinein. Für eine solche Wirkung kommen Stoffe in Frage, die zur Zunahme des cAMP führen, in unserem Fall also Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP (Brisson et al., 1972; und Hahn et al., 1980).

Kürzlich konnte von uns gezeigt werden, daß die glucoseinduzierte Calciumaufnahme durch Thioloxidantien wie t-Butylhydroperoxid, Diamid und DIP gehemmt werden kann, was vermuten läßt, daß der Calciumaufnahmeprozeß durch den voltabhängigen Calciumkanal irgendwie in Beziehung zu den Inselthiolen steht.

Es ist von Interesse festzustellen, daß diejenigen Substanzen in unseren Untersuchungen, deren insulinfreisetzende Wirkung thiolabhängig ist, die Calciumaufnahme in Pankreasinseln hervorrufen können. Die letztere Beobachtungen verstärken unsere Vermutungen, daß eine Modulierung des Redoxsystems der Inselthiole auch den Prozeß moduliert, über den Calcium durch den potential-abhängigen Kanal in die ß-Zelle eintritt.

Die Wirkung von Glucose und Glycerinaldehyd als potente Stimulatoren der Insulinsekretion haben viele gemeinsame Eigenschaften (Malaisse et al., 1976). Wenn es richtig ist, daß das Signal für die glucoseinduzierte Insulinsekretion durch den Glucosestoffwechsel produziert wird und zwar auf der Stufe der Triosen, dann scheinen unsere Ergebnisse, was die Thiolabhängigkeit, die Glucose- und Glycerinaldehydwirkung betrifft, zu zeigen, daß die insulinfreisetzende Wirkung auch so eines Signalmetaboliten thiolabhängig ist.

Verglichen mit Glucose und Glycerinaldehyd werden Mannose und Fructose nur geringfügig metabolisiert (Tarrett und Kean, 1968; Ashcroft et al., 1970) und sind deswegen wohl auch nur geringe Stimulatoren der Insulinsekretion. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse darauf hinzuweisen, daß der Zusatz von GSH und Diamid weder die Wirkung von Fructose noch die von Mannose auf die Sekretion von Insulin beeinflußt. Dies läßt vermuten, daß die Wirkung beider Substanzen nicht thiolabhängig ist. Es ist denkbar, daß die Unfähigkeit dieser Substanzen, auch eine deutliche Stimulation bei Calciumaufnahme herbeiführen, wie dies von Ishibashi et al., (1980) beobachtet wurde, in Zusammenhang mit ihrer Thiolabhängigkeit zu sehen ist.

Es ist ebenso von Interesse festzuhalten, daß wir nie eine Änderung der insulinfreisetzenden Wirkung, ausgelöst durch den Calciumionophor A 23187, durch GSH noch durch Diamid beobachten konnten (Ammon et al., 1983). Dies läßt vermuten, daß die insulinfreisetzende Wirkung des Ionophores ebenfalls nicht thiolabhängig ist. Kürzlich haben wir beobachtet, daß die Calciumaufnahme in die Pankreasinsel, hervorgerufen durch den Calciumionophor A 23187 nicht durch das Thioloxidans DIP gehemmt werden kann (Ammon et al., 1982a). Es scheint daher, daß der Redoxstatus von Inselthiolen in der Tat notwendig für eine physiologisch stimulierte Calciumaufnahme ist, jedoch nicht für eine Calciumaufnahme, die durch den lipophilen Ionophor hervorgerufen wird. Auf der anderen Seite zeigen unsere Ergebnisse aber auch, daß offensichtlich dann, wenn die Calciumkonzentration im Cytoplasma einmal angestiegen ist, wie z.B. bei dem Calciumionophor A 23187, alle weiteren Schritte in der Sequenz der Ereignisse, die letztlich zur Exozytose führen, nicht mehr thiolabhängig sind. Malaisse et al., (1980;1981) vermuten, daß die insulinfreisetzende Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf einer ionophoretischen Wirkung für Calcium beruht. Unsere Untersuchungen bezüglich der Thiolabhängigkeit der Freisetzung

von Insulin mit Glibenclamid (Ammon et al., 1983) scheinen diese Hypothese zu bestätigen. Auf der anderen Seite hält diese Hypothese nicht für die insulinfreisetzende Wirkung des Sulfonylharnstoffes Tolbutamid stand. Glibenclamid und Tolbutamid scheinen sich jedoch hinsichtlich ihrer Permeationsfähigkeit in die Pankreasinsel zu unterscheiden. Von Hellman et al.(1973) wurde berichtet, daß Tolbutamid nicht in die Inselzelle permeiert. Tolbutamid kann aus diesem Grund auch nicht als Calciumionophor wirken. Darüberhinaus wurde berichtet, daß Tolbutamid sowohl zu einer Stimulierung der elektrischen Aktivität als auch zu einer Hemmung des Kaliumaustritts führt (Meissner et al., 1979). Beide letzteren Befunde sind schwierig zu erklären, wenn man die Tolbutamidwirkung nur als eine Calciumionophorwirkung bezeichnen würde. Nimmt man dies zusammen, so bietet sich als Hypothese an, daß Tolbutamid möglicherweise über eine extrazelluläre Wirkung unter Vermittlung der Kaliumpermeabilität und der Calciumaufnahme die Sekretion von Insulin steigert, und daß diese Art der Tolbutamidwirkung in der Tat thiolabhängig ist.

Von Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP wird angenommen, daß sie zu einer Translokation von Calcium von intrazellulären Organellen (Mitochondrien, Granula, Cytoplasmamembran) in das Cytoplasma hineinführen und dadurch für einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sorgen (Brisson et al., 1972; Hahn et al., 1980). Da die insulinfreisetzende Wirkung von Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP anscheinend thiolunabhängig ist, eröffnet sich die Möglichkeit, daß eine Änderung des Redoxstatus der Inselzellthiole offensichtlich nichts mit der Calciumtranslokation, die durch diese Substanzen hervorgerufen wird, zu tun hat.

Faßt man die Ergebnisse des 2. Teils dieser Diskussion zusammen, so scheinen sie zu zeigen, daß man die Stimulatoren der Sekretion von Insulin in thiolabhängige und nicht thiolabhängigen trennen kann. Es ist auch für unsere

Befunde denkbar, daß diejenigen Stimulatoren, die zu einer physiologischen Steigerung der Calciumaufnahme führen, thiolabhängig sind, wogegen solche Stoffe, die die Calciumkonzentration im Cytoplasma auf andere Weise erhöhen, nicht thiolabhängig sind.

4.4. Thiole und cAMP-Anstieg

Kürzlich konnten wir beobachten (Ammon et al., 1982b), daß der durch Glucose hervorgerufene Anstieg von cAMP durch das Thioloxidans t-Butylhydroperoxid sowie durch Methylenblau gehemmt werden konnte. Dies legt nahe, daß die glucosestimulierte Bildung von cAMP thiolabhängig ist. In dieser Arbeit sollte jetzt, ähnlich wie im 2. Abschnitt der Diskussion, der Frage nachgegangen werden, ob umgekehrt durch Zusatz von GSH die durch Glucose stimulierte Zunahme von cAMP weiter gesteigert werden kann. Wie aus anderen Geweben bekannt ist, scheinen Thiole in einer Beziehung zur Adenylcyclase zu stehen (Baba et al., 1978; Mukherjee und Lynn, 1977; 1979). Wie aus Abb. 19-21 hervorgeht, führt GSH in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose nicht zu einer Änderung von cAMP, während es den durch 27,7 mM Glucose induzierten Anstieg weiter deutlich steigert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Zusatz von GSH per se nicht zu einer Zunahme von cAMP führt, jedoch die cAMP steigernde Wirkung von Glucose weiterhin potenziert. Wenn man in Betracht zieht, daß GSH sehr wahrscheinlich nicht durch die Membran der ß-Zelle permeiert (Dimant et al., 1955), so ist es denkbar, daß das zugesetzte Glutathion in irgendeiner Weise synergistisch auch die cAMP-Bildung und zwar durch eine Wirkung an der Cytoplasmamembran wirkt. Diese Interpretation steht in Einklang mit Ergebnissen von anderen, die vermuten lassen, daß in verschiedenen Geweben die Adenylcyclase irgendwie vom Redoxstatus der Thiole abhängig ist (Mukherjee und Lynn,

1977; 1979). Bisher wurde allerdings nicht untersucht, ob durch Zusatz von GSH auch die Wirkung von Glucagon, Isoproterenol auf das cAMP der Langerhansschen Insel weiter potenziert werden kann. Aus den Ergebnissen über die Insulinsekretion läßt sich jedoch vermuten, daß offensichtlich Zusatz von Thiolen nicht zu einer Potenzierung der stimulierenden Wirkung von Isoproterenol führen, da es hier auch nicht zu einer Potenzierung der Insulinsekretion kommt. Es ist aber durchaus denkbar, daß die durch Glucose induzierte Zunahme von cAMP möglicherweise durch die Steigerung des Calciuminfluxes hervorgerufen wird, während die durch Glucagon mit Isoproterenol-induzierte Zunahme von cAMP direkt die Folge einer Aktivierung der Adenylcyclase über den entsprechenden Glucagonrezeptor ist. Eine Stimulierung der Adenylcyclase durch Calciumionen wurde von Montague (1977) nachgewiesen. Es ist denkbar, daß durch die Blockade der Calciumaufnahme durch das Thiolsystem letzteres indirekt auch die Bildung von cAMP, soweit diese durch Glucose hervorgerufen wird, beeinflußt. Weitere Untersuchungen, die diesen Punkt abklären, sind jedoch erforderlich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Zielsetzung

1) Der Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG Systems spielt eine Rolle bei der Glucose induzierten Insulinsekretion. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch Zufuhr von exogenem GSH die Sekretion von Insulin steigern läßt.

2) Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die GSH-Abhängigkeit lediglich die Insulin sekretorische Wirkung von Glucose oder auch die von anderen Stimulatoren betrifft.

3) Zuletzt sollte noch untersucht werden, ob sich durch exogenes GSH eine Steigerung der durch Glucose hervorgerufenen Zunahme von cAMP in den Pankreasinseln erzielen läßt.

5.2. Ergebnisse

1) Am perfundierten Pankreas führte der Zusatz von GSH und L-Cystein ohne die Anwesenheit eines weiteren Stimulators (die Insulinsekretion) nicht zur Freisetzung von Insulin.

2) Dagegen wurde sowohl durch GSH als auch durch L-Cystein die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose gesteigert. Bei isolierten Pankreasinseln der Ratte erhöht die Zufuhr von Glutathion die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose und Glycerinaldehyd. Durch das Thioloxidans Diamid wurde dagegen die durch Glucose oder Glycerinaldehyd vermittelte Sekretion von Insulin gehemmt.

3) Eine Steigerung der Insulinsekretion durch GSH wurde auch bei der durch Tolbutamid induzierten Insulinsekretion beob-

achtet; Diamid führte dagegen zu deren Hemmung. Eine Steigerung der Insulinsekretion durch GSH wurde ebenfalls in Gegenwart der Aminosäure Leucin beobachtet, auch hier führte Diamid zur Hemmung der Leucin induzierten Sekretion.

4) Weder eine Steigerung durch GSH noch eine Hemmung durch Diamid fand sich bei der durch Glucagon, Isoprenalin oder db-cAMP induzierten Sekretion von Insulin.

5) Die durch Glucose hervorgerufene Steigerung des cAMP konnte durch GSH noch erhöht werden. In Abwesenheit einer die Insulinsekretion stimulierende Menge von Glucose hatte GSH keinen Effekt auf den cAMP-Gehalt der Langerhansschen Inseln.

5.3. Schlußfolgerungen

1) Die Tatsache, daß sich durch exogene Thiole die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose im perfundierten Pankreas steigern läßt, ist insofern von Interesse, als sich hier möglicherweise eine neue Klasse von Arzneistoffen finden lassen könnte, durch deren Hilfe man die Empfindlichkeit, mit der die ß-Zelle der Langerhansschen Insel gegenüber einem Glucosereiz reagiert, erhöhen läßt.

2) Hinsichtlich der Thiolabhängigkeit der Insulinsekretion gibt es offensichtlich Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulatoren der Sekretion. Während die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose, Glycerinaldehyd, Leucin und Tolbutamid abhängig zu sein scheint, trifft dies nicht für die Insulin freisetzende Wirkung von Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP zu. Dieser Unterschied der Thiolabhängigkeit könnte dadurch erklärt werden, daß die thiolabhängigen Stimulatoren der Insulinsekretion in erster Linie über eine Steigerung der Calciumaufnahme (welche ebenfalls thiolabhängig ist) initiieren, während die letztgenannten Stoffe vorwiegend über das cAMP wirken. Dabei besteht möglicher-

weise ein Unterschied zwischen der stimulierenden Wirkung von Glucose auf die Zunahme von cAMP und der stimulierenden Wirkung von Glucagon und Isoprenalin.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Allen, D.W., and Jandl, T.H.:
   Oxidative haemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action.
   J. Clin. Invest., 40, 454-475 (1961)

2. Ammon, H.P.T.:
   Effect of glucose and methylene blue (MB) on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancratic rat islets.
   Arch. Pharmacol., 272, Suppl. R 1 (Abstract) (1973)

3. Ammon, H.P.T.:
   Effect of tolbutamide on amino-phylline-,3,5-AMP-dibutyrate-or glucagon-induced insulin release from pancreatic islets after impairement of pyridine nucleotide metabolism caused by 6-aminonicotinamide (6-AN).
   N.S. Arch. Pharmacol., 290, 251-264 (1975)

4. Ammon, H.P.T.; Abdel-Hamid, M.; Rao, P.G.; and Enz,G.:
   Thiol dependent and non thiol dependent stimulations of insulin release.
   Diabetes, in press, (1983)

5. Ammon, H.P.T.; Akhtar, M.S.; Grimm, A.; Niklas, H.:
   Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ration and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
   Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 307, 91-96 (1979a)

6. Ammon, H.P.T.; Akhtar, M.S.; Niklas, H.; and Hegner,D.:
   Inhibition of p-Chloromercuribenzoate - and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butylhydroperoxide.
   Mol. Pharmacol., 13, 598-605 (1977)

7. Ammon, H.P.T.; Hägele, R.; Youssif, N.; Eujen, R.; and El-Amri, N.:
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology, in press, (1982a)

8. Ammon, H.P.T.; Heinzl, S.; Abdel Hamid, M.; Kallenberger, H-M., Hagenloh, I.:
Effect of diamide and reduced glutathione on the elevated levels of cyclic AMP in rat pancreatic islets exposed to glucose, p-Chloromercuri-benzoate and aminophylline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 319, 243-248 (1982b)

9. Ammon, H.P.T.; Hoppe, E.; Akhtar, M.S.; Niklas, H.:
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released-interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants and p-Chloromercuribenzoate.
Diabetes, 28, 593-599 (1979b)

10. Ammon, H.P.T.; and Verspohl, E.:
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology, 99, 1469-1476 (1976)

11. Ammon, H.P.T.; and Verspohl, E.T.:
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia, 17, 41-44 (1979)

12. Ashcroft, S.T.H.:
The control of insulin release by sugars.
Ciba Found. Symp., 41 (new series) 117-139 (1976)

13. Ashcroft, S.T.H.:
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia, 18, 5-15 (1980)

14. Ashcroft, S.J.H.; and Crossley, J.R.:
The effects of glucose, N-acetylglucosamine, glyceraldehyde and other sugars on insulin release in vivo.
Diabetologia, 11, 279-284 (1975)

15. Ashcroft, S.J.H.; Bassett, J.M.; and Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes, 21 (Suppl. 2), 538-545 (1972)

16. Ashcroft, S.J.H.; Crossley, J.R.; and Grossley, P.C.:
The effect of N-acylglucosamines on the biosynthesis and secretion of insulin in rat pancreatic islets.
Biochem. J., 154, 701-707 (1976)

17. Ashcroft, S.J.H.; Hedeskov, C.J.; and Randle, P.J.:
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J., 118, 143-154 (1970)

18. Ashcroft, S.J.H.; Randle, P.J.; and Täljedal, I-B.:
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.
FEBS Lett., 20, 263-266 (1972)

19. Ashcroft, S.J.H.; Weerasinghe, L.C.C.; and Randle, P.J.:
Interrelationships of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J., 132, 223-231 (1973)

20. Axelsson, K.; and Mannervik, B.:
Synthesis of a mixed disulfide of egg white lysozyme and glutathione-A model substrate for enzymatic reduction of protein mixed disulfides.
FEBS Lett., 53, 40-43 (1975)

21. Baba, A.; Lee, E.; Matsuda, T.; Kihara, T.; and Iwata, H.:
Reversible inhibition of adenylate cyclase activity of rat brain caudate nucleus by oxidized glutathione.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1204-1210 (1978)

22. Basabe, J.C.; Lopez, N.L.; Viktora, J.K.; and Wolff, F.W.:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas. I. Effect of tolbutamide, leucine and arginine; their interaction with diazoxide, and relation to glucose.
Diabetes, 20, 449-456 (1971)

23. Bloom, G.D.; Hellman, B.; Idahl, L.A.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; Täljedal, I-B.:
Effect of organic mercurials an mammalian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J., 129, 241-254 (1972)

24. Bowen, V.; and Lazarus, N.R.:
Glucose mediated insulin release: 3':5' cAMP phosphodiesterase.
Diabetes, 22, 738-743 (1973)

25. Brisson, G.R.; Malaisse-Lagae, F.; and Malaisse, W.J.:
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest., 51, 232-241 (1972)

26. Butcher, R.W.; and Sutherland, E.W.:
Adenosine-3'-5'-phosphate in biologicol meterials. I. Purification and properties of cyclic 3'-5' nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine-3'-5'-phosphate in human urine.
J. biol. Chem., 237, 1244-1250 (1962)

27. Capito, K.; Thams, P.; and Hedeskov, C.J.:
Total concentrations of NAD^+, NADH, $NADP^+$ and NADPH in mouse pancreatic islets during stimulation with glucose and fructose.
Diabetologia, 23 (2), 159 (1982)

28. Cehovic, G.; Posternak, T.; and Charollais, E.:
A study of the biological activity and resistance to phosphodiesterase of some derivatives and analogues of cyclic AMP.
Adv. Cycl. Nucl. Res., 1, 521-529 (1972)

29. Cerasi, E.:
Insulin secretion: mechanisms of the stimulation by glucose.
Quarterly Reviews of Biophysics, 8, 1-41 (1975)

30. Cerasi, E.; and Grill, V.:
Die Rolle des Zyklischen AMP bei der Kontrolle der Insulinsekretion.
Münch. Med. Wschr., 119, 1229-1236 (1977)

31. Claro, A.; Grill, V.; Efendic, S.; and Luft, R.:
Studies on the mechanisms of somatostatin action on insulin release. IV. Effect of somatostatin on cyclic AMP levels and phosphodiesterase activity in isolated pancreatic islets.
Acta endocr., 85, 379-388 (1977)

32. Charles, M.A.; Fanska, R.; Schmid, F.; Forsham, P.H.; and Grodsky, G.M.:
Adenosine 3'-5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release.
Science, 179, 569-571 (1973)

33. Charles, M.A.; Lawecki, I.; Steiner, A.D.; and Grodsky, G.M.:
Cyclic nucleotides in pancreatic islets. Tolbutamide and arginine-induced insulin release.
Diabetes, 25, 256-259 (1976)

34. Chasseaud, L.F.:
Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion. In: Glutathione: Metabolism and function, (eds.: Arias, I.M.; and Jakoby, W.B.)
Raven Press, New York, pp. 77-114 (1976)

35. Cooper, R.H.; Ashcroft, S.J.H.; and Randle, P.J.:
Concentration of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate in mouse pancreatic islets measured by a protein binding radioassay.
Biochem. J., 134, 599-605 (1973)

36. Couturier, E.; and Malaisse, W.J.:
Insulinotropic effects of hypoglycemic and hyperglycemic sulfonamides: The ionophoretic hypotheses.
Diabetologia, 19 (4), 335-340 (1981)

37. Curry, D.L.:
Is there a common beta cell insulin compartment stimulated by glucose and tolbutamide?
Amer. J. Physiol., 220, 319-323 (1971)

38. Curry, D.L.:
Fructose potentiation of mannose-induced insulin secretion.
Am. J. Physiol., 226, 1073-1076 (1974)

39. Curry, D.L.; Bennett, L.L.; and Grodsky, G.M.:
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocrinology, 83, 572-584 (1968)

40. Dimant, E.; Landberg, E.; and London, I.:
The metabolic behavior of reduced glutathione in human and avian erythrocytes.
J. Biol. Chem., 213, 769 (1955)

41. Donnelly, P.E.; and Turtle, J.R.:
Diabetes mellitus. A membrane receptor defect.
Aust. N.Z. J. Med., 4, 228-236 (1974)

42. Douglas, W.W.; Ishida, A.; Poisner, A.M.:
The effect of metabolic inhibitors on the release on vasopressin from isolated neurohypophysis.
J. Physiol. Lond., 181, 753-759 (1965)

43. Ellman, G.L.:
Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77 (1959)

44. Epstein, D.L.:
Introduction to discussion of lens and red cell membrane sulfhydryl groups.
Exp. Eye Res., 11, 351-355 (1971)

45. Erlichman, J.: Schubart, U.; Fleischer, N.:
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in Syrian hamster insolinoma cells.
Endocrinology, 105, 1183-1190 (1979)

46. Eujen, R.:
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin.
Dissertation, Tübingen, (1979)

47. Fajans, S.S.; Floyd, J.C.; Knopf, R.F.; and Conn, J.W.:
Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man.
Rec. Progr. Horm. Res., 23 617-656 (1967)

48. Fajans, S.S.R.; Quibrera, S.; Pek, J.; Floyd, H.N.; Christensen, H.; and Conn, J.W.:
Stimulation of insulin release in the dog by a non-metabolizable amino acid: comparison with leucine and arginine.
J. Clin. Endocrin. Metab., 33, 35-41 (1971)

49. Flohé, L.; and Günzler, W.A.:
Glutathione-dependent enzymatic oxido-reduction reactions. In: Glutathione: Metabolism and function (eds.: Arias, J.M.; and Jakoby, W.B.)
Raven Press, New York, pp. 17-34 (1976)

50. Flohé, L.; Günzler, W.A.; Tung, G.; Schaich, E.; and Schneider, F.:
Glutathion-Peroxidase, II. Substratspezifität und Hemmbarkeit durch Substratanaloge.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie, 352, 159-169 (1971)

51. Frandsen, E.K.; and Krishna, G.:
A single ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissues.
Life Sci., 18, 529-542 (1976)

52. Fussgänger, R.D.; Goberna, R.; and Heinz, M.:
Comparative studies on the dynamics of insulin secretion following HB 419 and tolbutamide of the perfused isolated rat pancreas and the perfused isolated pieces and islets of rat pancreas.
Horm. Metab. Res., 1 (Suppl), 34-40 (1969)

53. Gabbay, K.H.; and Tze, W.J.:
Inhibition of glucose-induced release of insulin by aldose reductase inhibitors.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 69, 1435-1439 (1972)

54. Gerich, J.E.; Charles, M.A.; and Grodsky, G.M.:
Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion.
Ann. Rev. Physiol., 38, 353-388 (1976)

55. Gilman, A.G.:
A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic-monophosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 305-312 (1970)

56. Gilman, A.G.; and Murad, F.:
Assay of cyclic nucleotides by receptor protein binding displacement.
In: Methods in Enzymology Vol. XXXVIII Hormone Action, Part C, Cyclic Nucleotides (eds.: J.G. Hardman, W. O'Malley) Academic Press, New York, San Francisco, London, S. 49 (1974)

57. Goldfine, I.D.; Roth, J.; and Birnbaumer, L.:
Glucagon receptors in ß-cells. Binding of ^{125}J and activation of adenylate cyclase.
J. biol. Chem., 247, 1211-1218 (1972)

58. Grill, V.; and Cerasi, E.:

Activation by glucose of adenylcyclase in pancreatic islets of the rat.
FEBS Lett., 33, 311-314 (1973)

59. Grill, V.; and Cerasi, E.:
Stimulation by D-glucose of cyclic adenosine-3'-5'-monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat.
J. biol. Chem., 249, 4196-4200 (1974)

60. Grill, V.; and Cerasi, E.:
Glucose-induced cyclic AMP accumulation in rat islets of Langerhans: preferential effect of the alpha anomer.
FEBS Lett., 54, 80-83 (1975)

61. Grill, V.; and Cerasi, E.:
Effect of hexoses and mannoheptulose on cyclic AMP accumulation and insulin secretion in rat pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Acta, 437, 36-50 (1976)

62. Grill, V.; and Cerasi, E.:
Interacting effects of sulfonylureas and glucose on cyclic AMP metabolism and insulin release in pancreatic islets of the rat.
J. Clin. Invest., 61, 1346-1354 (1978)

63. Grimm, A.:
Glutathion and Insulinsekretion:
Mikromethoden zur Bestimmung reduzierten und oxidierten Glutathions in Langerhansschen Inseln, Beziehungen zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation, Tübingen, (1978)

64. Grodsky, G.M.; Curry, D.; Landahl, H.; and Bennett, L.:
Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system.
Acta diabet. lat. 6, Suppl., 1, 554-579 (1969)

65. Grodsky, G.M.; Lee, J.; Fanska, R.; and Smith, D.:
Insulin secretion from the in vitro perfused pancreas of the rat: Effect of Ro- 4563 and other sulfonylureas.
In: Recent hypoglycemic sulfonylmeas. Mechanisms of action and clinical indications, pp. 83-94. (Dubach, U.C.; and Bückert, A. eds.). Bern: Huber (1971)

66. Günzler, W.A.:
Glutathionperoxidase, Kristallisation, Selengehalt, Aminosäurezusammensetzung und Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus.
Dissertation, Tübingen (1974)

67. Gylfe, E.:
Comparison of the effect of leucine, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase.
Acta Diabet. Lat., 13, 20-24 (1976)

68. Gylfe, E.; and Sehlin, J.:
Interactions between the metabolism of L-leucine and D-glucose in the pancreatic ß-cells.
Horm. Metab.Res., 8, 7-11 (1976)

69. Haest, C.W.M.; Kamp, D.; and Deuticke, B.:
Formation of disulfide bonds between glutathione and membrane SH groups in human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 557, 363-371 (1979)

70. Hahn, H.J.; Gylfe, E.; and Hellman, B.:
Calcium and pancreatic beta-cell function. 7. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium.
Biochim. Biophys. Acta, 630, 425-432 (1980)

71. Hanks, J.H.; and Wallace, E.R.:
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 196-200 (1949)

72. Harper, J.F.; and Brooker, G.:
Femtomole sensitive radioimmunoassay for 3':5'-cyclic nucleotide monophosphates after 2'0 acetylalain by acetic anhydride in aqueous solution.
J. Cycl. Nucl. Res., 1, 207-218 (1975)

73. Havu, N.:
Sulfhydrylinhibitors and pancreatic islet tissue.
Acta Endocrinol. (Copenhagen), 139, Suppl. 1-231 (1969)

74. Heinzl, S.:
Beziehungen zwischen den Redoxsystemen von NADPH/NADP und GSH/GSSG Langerhansscher Inseln und dem Stoffwechsel des cAMP.
Dissertation, Tübingen, (1979)

75. Hellman, B.:
On the mechanism of glibenclamide-induced insulin release.
Medikon, 4, 17-23 (1975)

76. Hellman, B.; and Täljedal. I-B.:
Effects of sulfonylureas derivatives on pancreatic ß-cells. In: Insulin II (Hasselblatt, A.; and Bruchhausen, F.V., eds.), pp. 175-194. Berlin, Heidelberg, New York: Springer (1975)

77. Hellman, B.; Idahl, L-A.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; and Täljedal, I-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. Comparisons of glucose with glyceralde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys., 162, 448-457 (1974a)

78. Hellman, B.; Idahl, L.A.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; and Täljedal, I-B.:
Membrane Sulphydryl Groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
in: Diabetes (Malaisse, W.J. and Priart, J. eds.), pp 65-78, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam (1974b)

79. Hellman, B.; Idahl, L.A.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; Täljedal, I-B.:
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta, 392, 101-109 (1975a)

80. Hellman, B.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; Täljedal, I-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. Inhibitory effect of a membrane probe on the islet uptake and insulin-releasing action of glibenclamide.
FEBS Lett, 34, 347-349 (1973)

81. Hellman, B.; Lernmark, A.; Sehlin, J.; Söderberg, M.; Täljedal, I-B.:
On the possible role of thiol groups in the insulin releasing action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents, and sulfonylureas.
Endocrinology, 99, 1398-1406 (1976)

82. Hellman, B.; Gylfe, E.; Berggren, P.O.; Andersson, T.; Abrahamsson, H.; Rorsman, P.; and Betsholtz, C.:
Ca^{2+}transport in pancreatic beta-cells during glucose stimulation of insulin secretion.
Ups. J. Med. Sci., 85 (3), 321-329 (1981)

83. Hellman, B.; Sehlin, J.; Söderberg, M.; Täljedal, I-B.:
The mechanisms of action of chloro-mercuribenzene-p-sulphonic acid as insulin secretagogue: fluxes of calcium, sodium and rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol., 252, 701-712 (1975b)

84. Hellman, B.; Sehlin, J.; Täljedal, I-B.:
Calcium uptake by pancreatic ß-cells as measured with the aid of ^{45}Ca and mannitol-^{3}H.
Amer. J. Physiol., 221, 1795-1801 (1971a)

85. Hellman, B.; Sehlin, J.; and Täljedal, I-B.:
The pancreatic recognition of insulin secretagogues. II. site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1384-1388 (1971b)

86. Hellman, B.; Sehlin, J.; and Täljedal, I-B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in microdissected pancreatic islets.
Biochem. J., 123, 513-521 (1971c)

87. Hellman, B., Sehlin, J.; and Täljedal, I-B.;
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. IV. Islet uptake of sulfonylureas.
Diabetologia, 9, 210-216 (1973)

88. Henquin, J.C.:
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 551-556 (1977)

89. Henquin, J.C.:
D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature, 271, 271-273 (1978)

90. Henquin, J.C.:
Matabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J., 186, 541-550 (1980)

91. Henquin, J.C.; and Meissner, H.P.:
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic ß-cells.
Biochim. Biophys. Acta, 543. 455-464 (1978)

92. Hoppe, E.:
Einfluß von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den NADPH/NADP-Quotienten und den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln
Dissertation, Tübingen, (1978)

93. Howell, S.L.; and Tyhurst, M.:
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia, rev., 22, 301-308 (1982)

94. Isaacs, I.; Binkley, F.:
Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue.
Biochim. Biophys. Acta, 497, 192-204 (1977)

95. Ishibashi, F.; Sato, T.; Onari, K.; Tsubota, M.; and Kawate, R.:
Metabolism, ^{45}Ca uptake and insulin releasing capacities of glucose and mannose.
Metabolism, 29 (7), 682-685 (1988)

96. Jain, K.; Logothetopoulos, J.; and Zucker, P.:
The effect of D- and L-glyceraldehyde on glucose oxidation, insulin secretion and insulin biosynthesis by pancreatic islets of the rat.
Biochim. Biophys. Acta, 399, 384-394 (1975)

97. Jarrett, J.; and Kean, H.:
Oxidation of sugars, other than glucose by isolated mammalian islets of Langerhans
Metabolism, 17, 155-157 (1968)

98. Jocelyn, P.C.:
Biochemistry of the SH-Group.
Academic Press, London, New York (1972)

99. Kawazu, S.; Sener, A.; Couturier, E.; and Malaisse, W.J.:
Metabolic, cationic and secretory effects of hypoglycemic sulfonylureas in pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 312, 277-283 (1980)

100. Kosower, E.M.:
A role for glutathione in muscle contraction.
Experientia, 26, 760-761 (1970)

101. Kosower, N.S.; and Kosower, E.M.:
Functional Aspects of Glutathione Disulfide and Hidden Forms of Glutathione.

102. Kosower, E.M.; and Werman,R.:
A new step in transmitter release at the myoneural junction.
Nature, 233, 121-123 (1971)

103. Kosower, E.M.; Correa, W.; and Kinan, B.J.:
Glutathione VII. Differentiation among substrates by the thiol oxidizing agent, diamide.
Biochim. Biophys. Acta, 264, 39-44 (1972)

104. Kosower, E.M.; Kosower, N.S.; Kenety-Londner, H.; and Levy, L.:
Glutathion IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP + 1, DIP + 2
Biochem. Biophys. Res. Comm., 59, 347-351 (1974)

105. Kowower, N.S.; Kosower, E.M.; Wertheim, B.; and Correa, W.S.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 593-596 (1969)

106. Kuo, W.N.; Hodgins, D.S.; and Kuo, J.F.:
Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents.
J. Biol. Chem., 248, 2705-2711 (1973)

107. Kuo, W.N.; Hodgins, D.; and Kuo, J.F.:
Regulation by various hormones and agents of adenosine-3'5'-monophosphate levels in islets of Langerhans of rats.
Biochem. Pharmacol., 23, 1387-1391 (1974)

108. Lacy, P.E.; and Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes, 16, 35-39 (1967)

109. Lacy, P.E.; Walker, M.M.; and Fink, C.J.:
Perfusion of isolated rat islets in vitro.
Diabetes, 21, 987-998 (1972)

110. Lambert, A.E.:
The regulation of insulin secretion.
Review Physiol. Biol. Pharmacol., 75, 97-157 (1976)

111. Landgraf, R.; Kotler-Brajtburg, J.; and Matschinsky, F.M.:
Kinetics of insulin release from the perfused rat pancreas caused by glucose, glucosamine and galactose.
Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 536-540 (1971)

112. Lenzen, S.:
The immediate insulin secretory response of the isolated perfused rat pancreas to tolbutamide and glucose.
FEBS Lett., 49, 407-408 (1975)

113. Lernmark, A.:
Specifity of leucine stimulation of insulin release.
Hormones, 3, 14-21 (1972)

114. Levey, G.S.; Schmidt, W.M.I.; and Mintz, D.H.:
Activation of adenylcyclase in a pancreatic islet cell adenoma by glucagon and tolbutamide.
Metabolism, 21, 93-98 (1972)

115. Levin, S.R.; Grodsky, G.M.; Hagura, R.; Smith, D.F.; and Forsham, R.H.:
Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Endocrin., 90, 624-631 (1972)

116. Losert, W.:
Bedeutung von Adenosin-3'-5'-monophosphat für Stoffwechselwirkungen verschiedener Hormone und Pharmaka.
Pharmazie, 28, 351-362 (1973)

117. Loubatiéres, A.:
Physiological and pharmacological aspects of the control role of the pancreas in the mode of action of hypoglycemic sulfonamides.
Acta diabet. lat., 6, Suppl. 1, 216-255 (1969)

118. Loubatières, A.:
Therapeutic modification of islet function.
Handb. Physiol. 1: (Sect. 7. Endocrinology):
653-664 (1972)

119. Lutz, S.:
Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte: Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin.
Dissertation, Tübingen, (1981)

120. Malaisse, W.J.:
Participation of the adenylate-cyclase system. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Insulin Part 2. (eds.: A. Hasselblatt, F. v. Bruchhausen), Springer, S. 131-143 (1975)

121. Malaisse, W.J.; and Malaisse-Lagae, F.:
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J. Lab. Clin. Med., 72, 438-448 (1968)

122. Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; and Meyhew, D.:
A possible role for the adenylcyclase-system in insulin secretion.
J. Clin. Invest., 46, 1724-1734 (1967a)

123. Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; and Wright, P.H.:
A new method for the measurement in vitro of pancreatic insulin secretion.
Endocrinology, 80, 99-108 (1967b)

124. Malaisse, W.J.; Brisson, G.R.; and Baird, L.E.:
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X Effect of glucose on ^{45}Ca efflux from perfused islets.
Am. J. Physiol., 224, 389-394 (1973)

125. Malaisse, W.J.; Herchuelz, A.; Levy, J.; Sener, A.; Pipeleers, D.G.; Devis, G.; Somers, G.; and Obberghen, E. van.:

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XIX. The insulinotropic effect of glyceraldehyde.
Molecular and Cellular Endocrinology, 4, 1-12 (1976)

126. Malaisse, W.J.; Hutton, J.C.; Carpinelli, A.R.; Herchuelz, A.; and Sener, A.:
The stimulus-secretion coupling of aminoacids-induced insulin release.
Metabolism and cationic effects of leucine.
Diabetes, 29, 431-437 (1980)

127. Malaisse, W.J.; Hutton, J.C.; Kawazu, S.; Herchuelz, A.; Valverde, I.; and Sener, A.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia, 16, 331-341 (1979a)

128. Malaisse, W.J.; Sener, A.; Boschero, A.C.; Kawazu, S.; Devis, G.; and Somers, G.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas.
Eur. J. Biochem., 87, 111-120 (1978a)

129. Malaisse, W.J.; Sener, A.; Herchuelz, A.; Hutton, J.C.:
Insulin release: the fuel hypothesis.
Metabolism, 28, 373-386 (1979b)

130. Malaisse, W.J.; Herchuelz, A.; Devis, G.; Somers, G.; Boschero, A.C.; Hutton, J.C.; Kawazu, S.; Sener, A.; Atwater, I.J.; Duncan, G.; Ribalet, B.; and Rojas, B.:
Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets.
In: Calciumtransport and cell junction. Eds.: Scarpa, A.; and Carafoli, E. Annals of the New York Acad. of Sciences, 307, 562-582 (1978b)

131. Malaisse, W.J.; Valverde, I.; Devis, G.; Somers, G.; and Couturier, E.:
Ionophore-mediated calcium translocation in artificial systems. I. A-23187-mediated calcium translocation.
Biochimie, 61, 1185-1192 (1979c)

132. Malbica, J.O.:
The effect of N,N,N',N'-tetramethylazoformamid (TMAF) on lysosomal stability in the presence and absence of anti-inflammatory agents.
B.B.R.C., 44, 1457-1463 (1971)

133. Mannervik, B.; and Eriksson, S.A.:
Enzymatic reduction of mixed disulfides and thiosulfate esters.
In: Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L.; Benöhr, H.Ch.; Sies, H.; Waller, H.D.; and Wendel, A. eds.) Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 120-131 (1974)

134. Mariani, M.M.:
The action of sulfonylureas on the insulin secretion of the perfused rat pancreas.
Acta diabet. lat. 6, Suppl. 1, 256-270 (1969)

135. Matschinsky, F.M.; and Ellermann, J.E.:
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans
J. Biol. Chem., 243, 2730-2736 (1968)

136. Matthews, E.K.; and Sakamoto, Y.:
Pancreatic islet cells: electrogenic and electrodiffusional control of membrane potential.
J. Physiol. (Land), 246, 439-457 (1975)

137. Mavier, P.; and Hanoune, J.:
Adenylate cyclase from rat-liver plasma membrane: inhibition by mersalyl and other mercurial derivatives.
Eur. J. Biochem., 59, 593-599 (1975)

138. Mayer, S.E.; Stull, J.T.; and Wastila, W.B.:
Rapid tissue fixation and extraction techniques.
In: Methods in Enzymology Vol. XXXVIII. Hormone Action, Part C, Cyclic Nucleotides (eds.: J.C. Hardman, W.O' Malley) Academic Press, New York, San Francisco, London, (1974)

139. Meissner, H.P.:
Electrical characterisation of the betacells in pancreatic islets.
J. Physiol. (Paris), 72, 757-767 (1976)

140. Meissner, H.P.; and Atwater, I.J.:
The kinetics of electrical activity of beta cells in response to a "square wave" stimulation by glucose or glibenclamide.
Horm. Metab. Res., 8, 11-16 (1976)

141. Meissner, H.P.; Preissler, M.; and Henquin, J.C.:
Possible ionic mechanisms of the electical activity induced by glucose and tolbutamide in pancreatic ß-cells.
In: Diabetes 1979, edited by Waldhäusl, W.K., Amsterdam: Excerpta Medica, p. 166-171 (1980)

142. Meister, A.:
On the enzymology of amino acid transport.
Science, 180, 33-39 (1973)

143. Milner, R.D.G.:
The mechanism by which leucine and arginine stimulate insulin secretion.
Biochim. Biophys. Acta, 192, 154-156 (1969)

144. Montague, W.:
Cyclic nucleotides, calcium and insulin secretion.
In: Cyclic 3',5'-nucleotides, Mechanisms of action. (Eds. Cramer, H.; and Schultz, J.) Wiley & Sons, London, New York, Toronto, 133-146 (1977)

145. Montague, W.; and Howell, S.L.:

The mode of action of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in mammalian islets of Langerhans. Effects of insulin secretagogues on islet-cell protein kinase activity.
Biochem. J., 134, 321-327 (1973)

146. Montague, W.; and Howell, S.L.:
Cyclic AMP and the physiology of the islets of Langerhans.
Adv. Cycl. Nucl. Res., 6, 201-243 (1975)

147. Mukherjee, S.P., and Lynn, W.S.:
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insulin.Possible role in the hormone's effect on adenylate cyclase and the hexose monophosphate shunt.
Arch. Bioch. Bioph., 184, 69-76 (1977)

148. Mukherjee, S.P.; and Lynn, W.S.:
Role of cellular redox state and glutathione in adenylate cyclase activity in rat adipocytes.
Biochem. Biophys. Acta, 568, 224-233 (1979)

149. NEN Cyclic AMP (^{125}J) RIA Kit.
Instruction Manual for the determination of cyclic AMP.

150. Orci, L.; Ravazzola, M.; Amherdt, M.; and Malaisse-Lagae, F.:
The ß-cell boundary.
Excerpta Medica I.C.S., 312, 104-118 (1974)

151. Pace, C.S.; Ellerman, J.; and Hover, B.A.:
Multiple metabolic functions of glucose in rat pancreatic islets.
Diabetes, 24, 476-488 (1975)

152. Panten, U.; and Christians, J.:
Effects of aminonorbornane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyri-

dine nucleotides of isolated perfused pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmac. exp. Path., 276, 55-62 (1973)

153. Panten, U.; Kriegstein, E.V.; Poser, W.; Schönborn, J.; and Hasselblatt, A.:
Effects of L-leucine and ∝-Keto-isocaproate upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets
FEBS Lett., 20, 225-228 (1972)

154. Panten, U.; Christians, J.; Kriegstein, E.V.; Poser, W.; and Hasselblatt, A.:
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perfused isolated pancreatic islets.
Diabetologia, 9, 477-482 (1973)

155. Panten, U.; Christians, J.; Kriegstein, E.V.; Poser, W.; and Hasselblatt, A.:
Studies on the mechanism of L-leucine and -Ketoisocaproic acid-induced insulin release from perfused isolated pancreatic islets.
Diabetologia, 10, 149-154 (1974)

156. Perkins, J.P.:
Adenyl cyclase.
Adv. Cycl. Nucl. Res., 3, 1-64 (1973)

157. Pillion, D.J.; Leibach, F.H.; von Tersch, F.; and Mendicino, J.:
Inhibition of protein kinase activity and amino acid and ∝-methyl-D-glucoside transport by diamide.
Biochim. Biophys. Acta, 419, 104-111 (1976)

158. Rabinovitch, A.; Grill, V.; Renold, A.E.; and Cerasi, E.:
Insulin release and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats.

J. Clin. Invest. 58, 1209-1216 (1976)

159. Rall, I.W.; and Lehninger, A.L.:
Glutathione reductase of animal tissues.
J. Biol. Chem., 194, 119-130 (1952)

160. Rink, H.:
In: Flohé, L.; Benöhr, H.; Sies, H.; Waller, H.D.; Wendel, A. (eds) Glutathione. Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. Thieme, Stuttgart, p. 213 (1974)

161. Robison, G.A.; Butcher, R.W.; and Sutherland, E.W.:
Cyclic AMP.
Academic Press, New York, London, (1971)

162. Rodbard, D.; Bridson, W.; and Rayford, P.L.:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med., 74, 770-781 (1969)

163. Ryan, W.G.; Nibbe, A.F.; and Schwartz, T.B.:
Beta-cytotropic effects of glucose, glucagon, and tolbutamide in man.
Lancet, 1, 1255-1256 (1967)

164. Sams, D.J.; and Montague, W.:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release. Properties of islet-cell adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase.
Biochem. J.; 129, 945-952 (1972)

165. Sener, A.; Hutton, J.C.; Kawazu, S.; Boschero, A.C.; Samers, G.; Devis, G.; Herchuelz, A.; Malaisse, W.J.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of $NH^{+}4$ in rat islets.
J. Clin. Invest., 62, 868-878 (1978)

166. Schauder, P.; Arends, J.; Schindler, B.; Ebert, R.; and Frerichs, H.;
Permissive effect of glucose on the glucagon-induced

accumulation of cyclic AMP in isolated rat pancreatic islets.
Diabetologia, 13, 171-175 (1977)

167. Schofield, J.:
Effect of sulfhydryl reagents on the release of ox grouth hormone in vitro.
Biochim. Biophys. Acta, 252, 516-526 (1971)

168. Schubart, U.K.; Shapiro, S.; Fleischer, N.; and Rosen, D.M.:
Cyclic adenosine 3':5'-monophoshate-mediated insulin secretion and ribosomal protein phosphorylation in a hamster islet cell tumor.
J. biol. Chem., 252, 92-101 (1977)

169. Schultz, G.:
Cyclische Nukleotide als intracelluläre Überträgerstoffe bei Hormonwirkungen.
Klin. Wschr., 49, 1049-1058 (1971)

170. Schultz, G.:
Die Bedeutung von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen.
Der Internist, 13, 159-166 (1972)

171. Sharp, G.W.G.; Wollheim, C.; Müller, W.A.; Gutzeit, A.; Truehart, P.A.; Blondel, B.; Orci, L.; and Renold, A.E.:
Studies on the mechanism of insulin release.
Fed. Proc., 34, 1537-1548 (1975)

172. Sies, C.; Gerstenecker, C.; Menzel, H.; and Flohé, L.:
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from Hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett., 27, 171-175 (1972)

173. Siliprandi, D.; Soutari, G.; Zoccarato, F.; and Siliprandi, N.:
Action of "Diamide" on some energy linked processes of rat liver mitochondria.
FEBS Lett., 42, 197-199 (1974)

174. Soeldner, J.S.; and Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes, 14, 771-779 (1965)

175. Srivastava, S.K.; Awasthi, Y.C.; and Dentler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes-Organic hydro-Peroxides.
Biochem. J.; 139, 289-295 (1974)

176. Sodoyez, J.C.; Sodoyez-Goffaux, F.; and Foa, P.P.:
Feedback regulation of insulin secretion by insulin: role of 3'-5'-cyclic AMP.
In: Structure and metabolism of the pancreatic islets (Eds.: Falkmer, R.; Hellman, B.; and Täljedal, I-B.).
Pergamon Press, Oxford, p. 445 (1969)

177. Storm, D.R.; and Dolginow, Y.D.:
Glucagon stimulation of adenylate cyclase sulfhydryl reactivity. Evidence for hormone-induced conformational changes.
J. biol. Chem., 248, 5208-5210 (1973)

178. Storm, D.R.; and Gunsalus, R.P.:
Methylmercuryl is a potent inhibitor of membrane adenyl cyclase.
Nature, 250, 778-779 (1974)

179. Sugden, M.C.; and Ashcroft, S.J.H. :
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on Calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia, 15, 173-180 (1978)

180. Sussman, K.E.; and Vaughan, G.P.:
Insulin release after ACTH, Glucagon and adenosine-3'-5'-phosphate (cyclic AMP) in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes, 16, 449-454 (1967)

181. Sutherland, E.W.:
Studies on the mechanism of hormone action.
Science, 177, 401-408 (1972)

182. Sutherland, E.W.; Rall, T.W.; and Menon, T.:
Adenylcyclase: I. Distribution, preparation, and properties.
J. biol. Chem., 237, 1220-1227 (1962)

183. Sutherland, E.W.; and Robison, G.A.:
The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism.
Diabetes, 18, 797-819 (1969)

184. Sutherland, E.W.; Robison, G.A.; and Butcher, R.W.:
Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP).
Circulation, 37, 279-306 (1968)

185. Tomita, T.; Lacy, P.E.; and Matschinsky, F.M.:
Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perfused in vitro.
Diabetes, 23, 517-524 (1974)

186. Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; and Stauffer, J.P.:
In: Manometric and biochemical techniques. 5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis, USA p. 146 (1972)

187. Veech, R.L.; Ellgleston, L.V.; Krebs, H.A.:
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver.
Biochem. J., 115, 609-619 (1969)

188. Verspohl, E.J.; and Ammon, H.P.T.:
Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans.
J. Clin. Invest., 65, 1230-1237 (1980)

189. Verspohl, E.J.; Händel, M.; and Ammon, H.P.T.:
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology, 105, 1269-1274 (1979)

190. Watkins, D.T.; and Moore, M.:
Effect of sulfhydryl-binding reagents on Insulin release from isolated secretion granules.
Endocrinology, 95, 485-491 (1974)

191. Wendel, A.; Heinle, H.; and Silbernagl, S.:
The degradation of glutathione derivatives in the rat kidney.
Curr. Prob. Clin. Biochem., 8, 73-84 (1978)

192. Werman, R.; Carlen, P.L.; Kushnir, M.; and Kosower, E.M.:
Effect of the thiol-oxidizing agent diamide on acetylcholine release at the frog endplate.
Nature, 233, 120-121 (1971)

193. Whikehart, D.R.; and Edelhauser, H.F.:
Glutathione in rabbit corneal endothelia: The effect of selected perfusion fluids.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 17, 455-464 (1978)

194. Zawalich, W.S.; Karl, R.C.; Ferrendelli, J.A.; and Matschinsky, F.M.:
Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'-5'-AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia, 11, 231-235 (1975)

195. Zawalich, W.S.; Dye, E.S.; Rognstad, R.; and Matschinsky, F.M.:
On the biochemical nature of triose- and hexose-stimulated insulin secretion.
Endocrinology, 103 (6), 2027-2034 (1979)

196. Zawalich, W.S.; Rognstad, R.; Pagliara, A.S.; and Matschinsky, F.M.:
A comparison of the utilization rates and hormone-releasing actions of glucose, mannose and fructose in isolated pancreatic islets.
L. Biol. Chem., 252, 8519-8523 (1977)

Lebenslauf

Name:	Abdel Hamid, Mustafa Abdel Monim
Geburtsort und -tag:	Kairo/Ägypten, 3. Juni 1948
Familienstand:	verheiratet mit Schadia geb. El Erian seit 1979, 2 Kinder

Schulischer Werdegang

1954 bis 1960	Grundschule
1960 bis 1963	Gymnasium (Preparatory school)
1963 bis 1966	Gymnasium (Secondary school)
Juni 1966	Abitur

Beruflicher Werdegang

Oktober 1966	Pharmaziestudium an der Universität Kairo, Ägypten
Mai 1969 bis Oktober 1969	Apothekenpraktikum
Juni 1971	Pharmazieabschlußprüfung "Bacheloris Pharmazie" mit dem Prädikat "sehr gut"
September 1971	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Fakultät für Pharmazie der Universität Kairo, Abteilung für Pharmakologie

Oktober 1971 bis Oktober 1972	Vorbereitungskurs in Mathematik, Statistik, Computer, physikalische Chemie, Instrumentalanalyse, Pharmakologie und Biochemie
Oktober 1972	Anfertigung der Magisterarbeit in Pharmakologie. Der Titel der Master-These hieß: "A study of antigenicity of some antibiotics in guinea-pigs"
Februar 1976	Magistergrad in Pharmazie (Pharmakologie)
Feb. 1976 bis April 1978	Assistent an der pharmakologischen Abteilung der Fakultät für Pharmazie, Kairo
April 1978	Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
April bis September 1978	Deutschkurs am Goethe-Institut , Freiburg
Oktober 1978	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
Oktober 1982	Abschluß der Arbeit

Meine akademischen Lehrer außer
Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Professoren und Dozenten:

Pharmakologie:	M.T. Khayyal, E.S.M. El Denschary, M.E. El Sayed, S. Saleh
Biochemie:	A. El-Masry, A. Khaier El Din
Pharmazeutisch-analytische Chemie:	H. Abu-Schadi, M. Ebeid, M. Amer, A.S. Ahmed
Organische Chemie:	M. Khalifa
Pharmakognosy und pharmazeutische Biologie:	S. Hellal, M.G. Mahran, M. Darwiesch
Technologie:	A.A. Kasim, S.A. Zaki, E. Nuor Eldin, M.S. Adel
Mikrobiologie:	M.A. Teema, O. El Tayeb